

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Зуева Анастасия Олеговна

**Изучение фукоиданаз морской бактерии *Wenyingshuangia fucanilytica* CZ1127^T и
противоопухолевой активности продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов**

Специальность 1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Ермакова Светлана Павловна

ВЛАДИВОСТОК – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Фукоиданазы	14
1.1.1 Номенклатура и классификация фукоиданаз	14
1.1.2 Продуценты фукоиданаз	16
1.1.3 Биохимические свойства фукоиданаз	17
1.1.4 Субстраты фукоиданаз	22
1.1.4.1 Фукоиданы. Общие сведения	22
1.1.4.2 Номенклатура и классификация фукоиданов	23
1.1.4.3 Особенности строения фукоиданов.....	25
1.1.4.4 Биологическая активность фукоиданов	28
1.1.5 Анализ ферментативной активности фукоиданаз.....	30
1.1.6 Тип действия и специфичность фукоиданаз	31
1.1.7 Пространственная структура фукоиданаз 107 структурного семейства гликозидгидролаз.....	45
1.2 Противоопухолевая и канцеропреventивная активности продуктов деполимеризации фукоиданов.....	48
2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	56
2.1 Идентификация и биоинформационный анализ фукоиданаз морской бактерии <i>W. fucanilytica</i> CZ1127 ^T	56
2.1.1 Идентификация и доменная организация фукоиданаз FWf1–4.....	56
2.1.2 Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фукоиданаз GN107 и FWf1–4	60
2.2 Получение рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии <i>W. fucanilytica</i> CZ1127 ^T ...	64
2.2.1 Получение генетических конструкций фукоиданаз FWf1–4.....	64
2.2.2 Оптимизация экспрессии и выделение рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4.....	64

2.2.2.1	Выбор штамма – продуцента фукоиданаз FWf1–4	64
2.2.2.2	Выделение и очистка рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4	66
2.3	Оптимальные условия проявления каталитической активности рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4.....	67
2.4	Определение типа действия рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии <i>W. fucanilytica</i> CZ1127 ^T	73
2.5	Определение субстратной специфичности рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии <i>W. fucanilytica</i> CZ1127 ^T	74
2.5.1	Действие фукоиданаз FWf1–4 на фукоиданы, выделенные из различных видов бурых водорослей	74
2.5.2	Совместное действие фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоидану, выделенному из бурой водоросли <i>F. evanescens</i>	77
2.5.3	Ферментативный гидролиз 4-О-десульфатированных фукоиданов с помощью рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4	78
2.5.4	Получение продуктов ферментативного гидролиза фукоидана из <i>F. evanescens</i> и установление их строения с помощью ЯМР-спектроскопии	80
2.5.5	Исследование специфичности фукоиданаз с использованием сульфатированных фукоолигосахаридов различной структуры	89
2.5.5.1	Действие фукоиданаз FWf1–4 на сульфатированные фукоолигосахариды различной структуры. Организация углеводсвязывающих подсайтов активного центра фукоиданаз.....	90
2.6	Исследование противоопухолевой активности продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов из бурых водорослей.....	96
2.6.1	Противоопухолевое действие фукоидана FeF и продуктов его ферментативного гидролиза	96
2.6.2	Действие фукоидана FeF и продуктов его ферментативного гидролиза на образование колоний опухолевых клеток и неопластическую трансформацию нормальных клеток, индуцированные эпидермальным фактором роста	106
2.7	Применение фукоиданазы FWf1 для изучения структуры фукоидана из <i>A. angusta</i> ...	113
2.7.1	Противоопухолевое и канцеропреентивное действие фукоидана 1AaF2 и высокомолекулярных продуктов его ферментативного гидролиза.....	116

3	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	120
3.1	Материалы и реагенты	120
3.2	Общие методы исследования	122
3.2.1	Определение общих сахаров	122
3.2.2	Определение содержания сульфатных групп.....	122
3.2.3	Определение моносхаридного состава полисахаридов	122
3.2.4	Определение концентрации белка.....	122
3.2.5	ДСН-ПААГ электрофорез белков.....	122
3.3	Методы биоинформатического анализа.....	123
3.3.1	Идентификация фукоидандеградирующего кластера	123
3.3.2	Анализ аминокислотных последовательностей фукоиданаз	123
3.3.3	Построение моделей трехмерных структур фукоиданаз.....	124
3.4	Методы получения рекомбинантных фукоиданаз	125
3.4.1	Выделение и очистка геномной ДНК.....	125
3.4.2	Получение генетических конструкций фукоиданаз	125
3.4.3	Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	126
3.4.4	Оптимизация экспрессии рекомбинантных фукоиданаз в штаммах <i>E. coli</i>	126
3.4.5	Получение рекомбинантных фукоиданаз	127
3.4.6	Выделение и очистка рекомбинантных фукоиданаз	127
3.4.7	Определение активности фукоиданаз	128
3.5	Характеристика биохимических свойств фукоиданаз.....	129
3.5.1	Определение влияния ионов мультивалентных металлов на активность фукоиданаз.....	129
3.5.2	Определение рН оптимума активности фукоиданаз	129
3.5.3	Определение температурного оптимума активности фукоиданаз	129
3.5.4	Кинетика ферментативного гидролиза фукоидана	130
3.6	Определение субстратной специфичности фукоиданаз	130
3.6.1	Получение 4-О-десульфатированных производных фукоиданов	130

3.6.2	Получение и выделение продуктов ферментативного гидролиза фукоидана	130
3.6.3	Получение 2-AB-меченных олигосахаридов.....	132
3.6.4	Определение молекулярной массы фукоиданов и их ферментативных производных	132
3.6.5	Определение степени полимеризации олигосахаридов в низкомолекулярных производных фукоидана.....	132
3.6.6	ЯМР-спектроскопия.....	133
3.7	Методы исследования <i>in vitro</i> биологической активности.....	134
3.7.1	Культивирование клеток	134
3.7.2	Определение цитотоксического эффекта FeF и продуктов его гидролиза.....	134
3.7.3	Изучение действия фукоиданов и их производных на самопроизвольное формирование и рост колоний клеток рака.....	134
3.7.4	Изучение действия фукоиданов и их производных <i>in vitro</i> на формирование и рост колоний клеток, индуцированные EGF	135
3.7.5	Статистический анализ данных	135
	ВЫВОДЫ.....	136
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139
	<i>Приложение 1</i>	163
	<i>Приложение 2</i>	164
	<i>Приложение 3</i>	166
	<i>Приложение 4</i>	168
	<i>Приложение 5</i>	172

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- А. о. – аминокислотный остаток;
- БСА – бычий сывороточный альбумин;
- ВМП – высокомолекулярные продукты реакции;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ДСН – додецилсульфат натрия;
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид;
- НМП – низкомолекулярные продукты реакции;
- ОП – оптическая плотность;
- ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле;
- П. о. – пара оснований;
- ПСА – персульфат аммония;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- С. о. – стандартное отклонение;
- СП – степень полимеризации;
- ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин;
- ТФУ – трифторуксусная кислота;
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- 2-АВ – 2-аминобезамид;
- ВМЕ (Basal Medium Eagle) – питательная среда для культур клеток;
- CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) – база данных углеводов-активных ферментов;
- CDD (Conserved Domain Database) – база данных консервативных доменов;
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – питательная среда для культур клеток;
- EGF (Epidermal Growth Factor) – эпидермальный фактор роста;
- EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – рецептор эпидермального фактора роста;
- ИЭР-МС – масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением;
- FBS (Fetal Bovine Serum) – эмбриональная телячья сыворотка;
- L-Fucp – L-фукопираноза;
- FWf1 – фукоиданаза AXE80_07305 (CAZy) из морской бактерии *Wenyingshuangia fucanilytica* CZ1127^T;
- FWf2 – фукоиданаза AXE80_07310 (CAZy) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T;
- FWf3 – фукоиданаза AXE80_07420 (CAZy) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T;
- FWf4 – фукоиданаза AXE80_07425 (CAZy) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T;

FWf1–4 – фукоиданазы FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4;

D-Gal – D-галактоза;

D-Glc – D-глюкоза;

LB (Lisogenic Broth) – среда для культивирования рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*;

D-Man – D-манноза;

MEM (Minimum Essential Medium Eagle) – питательная среда для культур клеток;

PBS (Phosphate-buffered saline) – натрий-фосфатный буфер;

PDB (Protein Data Bank) – база данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот;

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) – питательная среда для культур клеток;

L-Rha – L-рамноза;

UA – уроновая кислота;

D-Xyl – D-ксилоза.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. Биологические катализаторы, ферменты, играют центральную роль в химии живой природы, катализируя большинство сложных биохимических процессов, протекающих в живых организмах. Уже около 100 лет ферментные препараты используются в биотехнологии для катализа широкого спектра важных с коммерческой точки зрения процессов. Гликозидгидролазы, участвующие в гидролизе гликозидных связей в молекулах природных полисахаридов, нашли широкое применение в производстве моющих средств, целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, биоэнергетическом сегменте и медицине [1–3]. Изначально большая часть ферментов для коммерческого применения извлекалась из источников животного и растительного происхождения, поскольку считалось, что они лишены токсичных примесей, в отличие от ферментов микробного происхождения. Однако, по мере развития технологий ферментации и роста спроса на них, ферменты из микробных источников были признаны конкурентоспособными и стали широко использоваться. По сравнению с ферментами растительного и животного происхождения микробные ферменты имеют экономические, технические и этические преимущества [4].

В современном мире гликозидгидролазы, участвующие в трансформации полимеров морского происхождения, такие как агаразы, хитиназы, ксиланазы, альгинат-лиазы и др., представляют большой интерес для применения во многих отраслях, например, для производства биотоплива, для удаления гелей при добыче нефти и газа путем гидравлического разрыва пласта и даже для предотвращения инвазии рыб в рыбоводстве [5]. Для медицины, фармакологии и пищевой индустрии особенно перспективным направлением является разработка технологий получения олигосахаридов путем ферментативной деполимеризации различных биологически активных морских полисахаридов. Одним из представителей таких полисахаридов является фукоидан, основным структурным компонентом которого являются остатки α -L-фукозы, этерифицированные серной кислотой. Благодаря широкому спектру разнообразных биологических активностей фукоидан является объектом интенсивного изучения на протяжении последних 15 лет и привлекает внимание исследователей всего мира [6, 7]. Большое число публикаций посвящено изучению противоопухолевой активности фукоиданов, поскольку поиск нетоксичных природных соединений, обладающих потенциалом для применения в терапии рака, является крайне актуальной задачей. Несмотря на десятилетия фундаментальных и клинических исследований перспективных новых лекарств, в промышленно развитых странах уровень смертности от онкологических заболеваний стоит на втором месте после сердечно-сосудистых [8], а используемые в настоящее время в химиотерапии препараты вызывают нежелательные побочные эффекты [9].

На сегодняшний день известно, что фукоиданы способны снижать пролиферацию [10] и способность опухолевых клеток к метастазированию [11, 12], а также стимулировать апоптоз клеток [13, 14], не оказывая при этом цитотоксического действия по отношению к нормальным клеткам и тканям. Противоопухолевые свойства фукоиданов обусловлены их структурными особенностями, такими как молекулярная масса, моносакхаридный состав, содержание и расположение сульфатных групп, степень разветвленности и другими. При этом структуры фукоиданов варьируют в зависимости от множества эндогенных и экзогенных факторов [15–17] и поражают своим разнообразием. Поэтому установление структурных элементов, ответственных за противоопухолевую активность фукоиданов, и разработка фармацевтических препаратов на их основе представляется сложной задачей. Для решения трудностей с установлением структур и стандартизацией фукоиданов перспективными инструментами являются фукоидантрансформирующие ферменты. Поиск и изучение новых фукоидантрансформирующих ферментов являются необходимыми для совершенствования и разработки новых методов изучения структур этих сложных биополимеров. Перспективными источниками таких ферментов являются бактерии, использующие бурые водоросли в качестве пищи.

Фукоиданазы – O-гликозидгидролазы, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах фукоиданов и фукансульфатов. В результате их действия образуются производные с молекулярными массами ниже, чем у исходного фукоидана. Установление их структур дает информацию как о структурных фрагментах фукоидана, так и о субстратной специфичности фермента. В зависимости от структурных особенностей, такие производные могут проявлять повышенную противоопухолевую активность [18–21].

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось определение структурных, биохимических и каталитических различий между представителями фукоиданаз 107 структурного семейства гликозидгидролаз (GH107) морской бактерии *Wenyingshuangia fucanilytica* CZ1127^T, а также оценка перспектив применения данных ферментов для изучения структур фукоиданов и выявления структурных элементов, ответственных за их противоопухолевую активность *in vitro*.

Исходя из цели работы, были поставлены следующие задачи:

1. идентифицировать гены, кодирующие фукоиданазы морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T;
2. провести биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей потенциальных фукоиданаз семейства GH107 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T;

3. получить каталитически активные рекомбинантные фукоиданазы семейства GH107 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T;
4. провести сравнительное изучение биохимических свойств полученных рекомбинантных фукоиданаз;
5. установить субстратную специфичность полученных рекомбинантных фукоиданаз и определить тип их действия;
6. провести деполимеризацию фукоиданов с помощью исследуемых рекомбинантных фукоиданаз и установить структуры продуктов реакции;
7. изучить противоопухолевое действие полученных продуктов ферментативной деполимеризации фукоиданов.

Научная новизна и практическая значимость исследования. В данной работе впервые подставлены данные о биохимических свойствах, детальной специфичности и типе действия рекомбинантных фукоиданаз семейства GH107 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. Было впервые показано, что гликозидгидролазы семейства GH107 имеют комплексную специфичность и могут содержать различное количество углеводсвязывающих подсайтов в своих активных центрах, при этом их специфичность может различаться в отношении не только типа гликозидной связи, но и расположения сульфатных групп при остатках α -L-фукозы, находящихся в непосредственной близости от места расщепления гликозидной связи. Исследуемые ферменты были классифицированы как эндо- α -1 \rightarrow 4-L-фукоиданазы (шифр КФ 3.2.1.212). На примере фукоиданов из *Fucus evanescens* и *Alaria angusta* были продемонстрированы перспективы применения новых ферментов в качестве инструментов для исследования структур фукоиданов.

С помощью исследованных ферментов были получены производные фукоидана из *F. evanescens* значительно превосходящие противораковый эффект исходного фукоидана. Кроме того, некоторые из полученных производных продемонстрировали высокую избирательность действия по отношению к определенным типам раковых клеток. Исследование канцеропреентивной активности фукоиданов и их ферментативных производных впервые показало, что важность определенных структурных элементов фукоиданов, ответственных за их усиленное противораковое действие, может различаться не только по отношению к различным типам раковых клеток, но и зависеть от определенных экзогенных факторов, воздействующих на раковые клетки.

Так, было показано, что исследованные фукоиданазы имеют перспективы использования в биомедицине для получения производных фукоиданов с повышенной противоопухолевой

активностью. Такие производные имеют потенциал для использования в качестве биологически активных добавок или лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составляют научные статьи, посвященные изучению фукоиданов и деполимеризующих их ферментов, опубликованные в отечественных и зарубежных изданиях. Методологическую основу исследования составляют: широкий спектр физико-химических методов анализа, включая хроматографию (аффинную, ионообменную, гельпроникающую), электрофорез (ПААГ-электрофорез углеводов, ПААГ-электрофорез белков в денатурирующих условиях и нуклеиновых кислот в агарозном геле), ЯМР-спектроскопию и масс-спектрометрию; классические методы белковой химии; методы молекулярной и клеточной биологии; методы генной инженерии; методы биоинформатического анализа (анализ аминокислотных последовательностей белков, построение пространственных моделей белков). Для оценки достоверности полученных результатов был использован метод математической статистики ANOVA.

Степень достоверности результатов. Для получения результатов в ходе данного исследования были использованы современные методы и оборудование. Достоверность результатов подтверждается воспроизводимостью и согласованностью данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штамм морской бактерии *W. fucanilytica* CZ127^T является продуцентом как минимум четырех фукоиданаз семейства GH107 (FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4).
2. Исследуемые фукоиданазы имеют мультидоменную организацию и содержат помимо каталитического по 3-4 дополнительных домена, состав и количество которых в фукоиданазах GH107 различается. Состав и расположение некоторых остатков аминокислот в активных центрах исследуемых фукоиданаз варьируется.
3. Фукоиданазы FWf1–4 имеют различия в оптимумах pH и температур, а также в отношении к солям различных металлов.
4. Специфичность исследуемых фукоиданаз отличается по отношению к фукоиданам различных структур и определяется топологией их углеводсвязывающих подсайтов, количество и селективность которых различается. Фукоиданазы FWf1–4 являются эндо- α -1 \rightarrow 4-L-фукоиданазами (шифр КФ 3.2.1.212).
5. Важность определенных структурных элементов (степени сульфатирования и расположения сульфатных групп) и молекулярной массы для проявления

противоопухолевой активности фукоиданом из *F. evanescens in vitro* варьирует по отношению к различным типам раковых клеток.

6. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *F. evanescens*, и его ферментативные производные проявляют селективность противоопухолевого действия по отношению к разным типам опухолевых клеток.
7. Фукоиданы из *F. evanescens* и *A. angusta*, а также их ферментативные производные, обладают канцеропревентивной активностью *in vitro*: ингибируют формирование колоний нормальных и раковых клеток, индуцированное EGF.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019 г.); IX Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019 г.); XVII Всероссийской молодёжной онлайн школе-конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Владивосток, 2020 г.); X Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Сочи, 2021 г.); Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов» (Владивосток, 2022 г.), VI Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Мурманск, 2023 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science (Q 1) и рекомендованных ВАК РФ, а также 10 тезисов докладов научных конференций.

Личный вклад соискателя в проведении исследования. Основная часть результатов была получена автором работы лично, за исключением данных ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Соискателем был выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, написаны статьи и подготовлены доклады для представления полученных результатов на конференциях. На защиту вынесены только те положения и результаты, в получении которых роль автора была определяющей.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Литературный обзор, Результаты и их обсуждение, Экспериментальную часть, Выводы, Заключение и Список литературы. Список литературы включает 225 источников. Диссертация изложена на 172 страницах и содержит 49 рисунков, 7 таблиц и 5 приложений.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность своему научному руководителю доценту, д.х.н. Ермаковой С.П. за руководство и помощь на всех этапах выполнения работы. Автор также выражает благодарность сотруднику лаборатории

химии ферментов к.х.н. Сильченко А.С. за помощь в установлении моносхаридного состава и молекулярных масс исследуемого фукоидана и его производных, а также за поддержку и ценные советы на протяжении выполнения диссертационной работы. Автор благодарит сотрудника лаборатории микробиологии к.б.н. Куриленко В.В. за культивирование штамма морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. Автор благодарит сотрудников лаборатории химии ферментов к.х.н. Расина А.Б. и к.х.н. Усольцеву Р.В., а также сотрудников лаборатории физико-химических методов исследования д.х.н. Калиновского А.И., к.х.н. Исакова В.В. и Звягинцева Н.В. за запись, анализ и расшифровку спектров ЯМР ¹H/¹³C. Автор благодарит сотрудника лаборатории физико-химических методов исследования к.х.н. Анастюка С.Д. за проведение масс-спектрометрических исследований. Автор выражает признательность сотруднику лаборатории химии ферментов к.х.н. Маляренко О.С. за помощь в освоении некоторых методов клеточной биологии. За ценные советы и рекомендации по оформлению диссертационной работы автор благодарит сотрудника лаборатории химии ферментов доцента, д.б.н. Кусайкина М.И. и сотрудника лаборатории химии морских природных соединений д.х.н. Авилова С.А. Автор также выражает искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН за всестороннюю поддержку и продуктивные обсуждения полученных результатов в ходе выполнения работы.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фукоиданазы

Впервые термин «фукоиданазы» был употреблен в отношении ферментативного препарата из гепатопанкреаса морского моллюска *Haliotus* sp. в работе Н. М. Танасси (Thanassi N. M.), опубликованной в 1967 г. [22]. Фукоиданазы представляют собой ферменты, катализирующие деполимеризацию фукоиданов путем расщепления гликозидных связей между остатками сульфатированной α -L-фукозы. Высокая специфичность этих ферментов позволяет получать сульфатированные олигосахариды, не прибегая к многостадийному химическому синтезу, который отличается высокой трудоемкостью [23].

Поиск, открытие и характеристика новых ферментов, деполимеризующих фукоидан, необходимы для углубления понимания механизмов функционирования этих ферментов, а также разработки технологий их использования для получения биологически активных производных фукоиданов. Кроме того, важно расширить возможности применения ферментов в качестве инструментов для установления сложных химических структур фукоиданов.

1.1.1 Номенклатура и классификация фукоиданаз

В соответствии с решением Номенклатурного комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB) фукоиданазы отнесены к классу 3 – гидролазы, подклассу 3.2 – гликозилазы, подподклассу 3.2.1 – гликозидазы, т.е. ферменты, катализирующие гидролиз O- и S-гликозильных соединений.

В настоящее время, согласно классификации ферментов по типу катализируемой реакции, эндо- α -1 \rightarrow 4-L-фукоиданазам присвоен шифр КФ 3.2.1.212, а эндо- α -(1 \rightarrow 3)-L-фукоиданазам – КФ 3.2.1.211. Длительное время фукоиданазы имели укороченный шифр КФ, и присвоение порядкового номера фермента по типу расщепления гликозидной связи стало возможным лишь в 2020 году благодаря успехам в изучении их специфичности. Примечательно, что изначально эндо-фукоиданазам был присвоен шифр КФ 3.2.1.44, как ферментам, катализирующим гидролиз α -1 \rightarrow 2-гликозидных связей, что являлось ошибкой, произошедшей по причине неточно установленной структуры фукоидана из *Fucus gardneri*, использованного в качестве субстрата. До настоящего времени о фукоиданазам, специфичных к расщеплению α -1 \rightarrow 2-гликозидных связей, больше не упоминалось.

Согласно классификации, основанной на гомологии аминокислотных последовательностей CAZy (Carbohydrate Active Enzyme (www.cazy.org)), большинство известных фукоиданаз было классифицировано как члены трех семейств гликозидгидролаз: GH107, GH168 и GH174. На сегодняшний день к семейству GH107 относятся эндо-фукоиданазы, катализирующие расщепление как α -1 \rightarrow 4- так и α -1 \rightarrow 3-гликозидных связей в

молекулах фукоидана, в то время как известные эндо-фукоиданазы семейства GH168 катализируют гидролиз только α -1 \rightarrow 3-гликозидных связей. Представители открытого в 2023 году семейства GH174 также известны как эндо- α -1 \rightarrow 3-L-фуканазы, не нашедшие гомологов среди членов GH107 и GH168.

В настоящее время (июнь 2023 г.) база данных CAZy содержит информацию о 36 последовательностях предполагаемых фукоиданаз семейства GH107, среди которых 12 фукоиданаз считаются охарактеризованными. К семейству GH168 отнесены последовательности 47 предполагаемых фукоиданаз, и только один из этих ферментов был охарактеризован. После открытия и характеристики первого представителя семейства GH174 [24] к этому семейству были отнесены 92 аминокислотных последовательности предполагаемых фукоиданаз.

Стремительное изучение трехмерных структур гликозидгидролаз привело к необходимости создания подходящей последовательной номенклатуры, основанной на определении участков или подсайтов, связывающих углеводные фрагменты полисахаридов – субстратов. Первой такой номенклатурой была алфавитная номенклатура, предложенная Д. Филлипсом (Phillips D. C.) в 1967 году [25], для обозначения подсайтов связывания субстрата в активном центре лизоцима (HEWL) – первого белка, структура которого была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа (Рисунок 1, А). В 1997 году Г. Дэвис (Davies G. J.) предложил усовершенствованную номенклатуру подсайтов связывания по отношению к точке расщепления субстрата [26]. В основу номенклатуры положены два критерия: первый – положение подсайта относительно точки расщепления, второй – подсайт не должен изменять свой номер, когда становятся известны новые комплексы с дополнительными углеводными звеньями как на восстанавливающем, так и на невосстанавливающем концах. Подсайты нумеруются отрицательными числами (-1, -2, -3 и т. д.) по направлению от точки расщепления к невосстанавливающему концу и положительными числами (+1, +2, +3 и т. д.) к восстанавливающему концу.

Согласно данной номенклатуре эндо-гликаназы имеют в активном центре несколько подсайтов связывания как с невосстанавливающего, так и с восстанавливающего конца молекулы субстрата и обозначаются от $-n$ до $+n$ (Рисунок 1, Б). Экзо-гликозидазы, которые являются специфичными для определенного сахара, но менее специфичны для агликона, такие как β -галактозидаза, имеют только два подсайта, -1 и +1, при этом менее специфичны в +1 (Рисунок 1 В). Аналогичным образом ферменты, расщепляющие связи в дисахаридных звеньях, например, хитобиаза, представляют собой -1, +1 ферменты, но с большей селективностью +1 подсайте (Рисунок 1 В). Экзо-гликаназы, катализирующие отщепление моносахарида с невосстанавливающего конца полимерного субстрата, такие как глюкоамилаза, являются -1, $+n$

ферментами с $n > 1$ (Рисунок 1 Г). Аналогично по отношению к ферментам, отщепляющим дисахариды с невозстанавливающего конца субстрата, например, β -амилаза имеет подсайты от -2 до $+n$, где $n > 2$ (Рисунок 1 Д), или целлюбиогидролаза СВН-I из *Trichoderma reesei*, которая отщепляет целлобиозу с восстанавливающего конца полимера, имеет подсайты от $-n$ до $+2$ (Рисунок 1 Е).

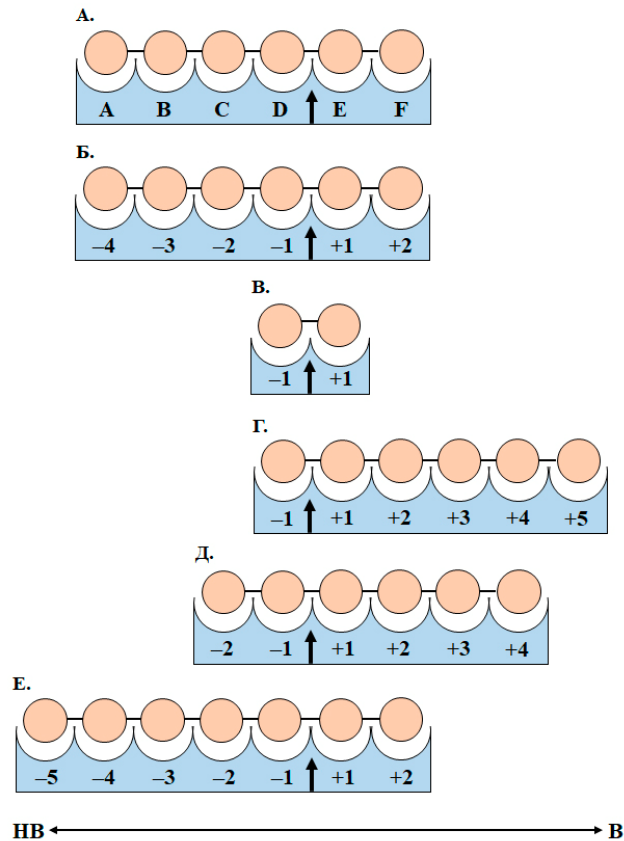


Рисунок 1 – Схематическое изображение углеводсвязывающих подсайтов на примере нескольких гликозидгидролаз: (А) подсайты HEWL, обозначенные в соответствии с алфавитной номенклатурой; (Б) подсайты HEWL, помеченные в соответствии с $-n$, $+n$ номенклатурой; (В) система $-n$, $+n$ применительно к неспецифическим моногликозидазам и дисахаридазам; (Г) система $-n$, $+n$ применительно к ферментам, отщепляющим моносахарид от невозстанавливающего конца субстрата, таким как глюкоамилаза; (Д) система $-n$, $+n$ применительно к ферментам, отщепляющим дисахаридные звенья от невозстанавливающего конца субстрата, таким как β -амилаза; (Е) система $-n$, $+n$, применяемая к ферментам, отщепляющим дисахаридные звенья от восстанавливающего конца субстрата, предложенная для целлюбиогидролазы СВН-I из *Trichoderma reesei*.
НВ – невозстанавливающий конец молекулы субстрата, В – восстанавливающий конец молекулы субстрата

1.1.2 Продуценты фукоиданаз

Фукоиданазы, как и другие фукоидандеполимеризующие ферменты, до сих пор были обнаружены только в морских организмах: бактериях, грибах и беспозвоночных. Наибольшее

число публикаций посвящено изучению фукоиданаз из бактериальных источников, таких как *Vibrio* sp. [27], *Alteromonadaceae* [28], *Pseudoalteromonas* sp. [29] или *Flavobacteriaceae* [30]. Также фукоиданазы были обнаружены в симбионтах (например, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*), ассоциированных с бурыми водорослями или морскими беспозвоночными [31]. Немногочисленные публикации о фукоиданазах эукариотических организмов [32], таких как морские ежи [33] и моллюски [34, 35], можно объяснить сложностью получения этих ферментов в виде рекомбинантных белков.

Несколько публикаций свидетельствуют о способности некоторых видов морских грибов продуцировать фукоидандеполимеризующие ферменты, например, *Fusarium* sp. LD8 [36], *Aspergillus niger* PSH и *Mucor* sp.3P [37], а также грибы семейства *Trichosomaceae* и *Mucogaceae* [38]. Из грибов вида *Dendryphiella arenaria* была выделена фукоиданаза в гомогенном виде и частично охарактеризована [39].

1.1.3 Биохимические свойства фукоиданаз

Несмотря на активное изучение ферментов, деполимеризующих фукоиданы, информация о биохимических свойствах фукоиданаз представлена в ограниченном числе исследований. Авторы не часто приводят данные о таких характеристиках как рН-оптимум, рН-стабильность, температурный оптимум, температурная стабильность и т.д., однако эта информация представляется важной для эффективной работы по изучению ферментов.

Несомненно, наибольшую ценность имеет информация о свойствах ферментов, выделенных и очищенных до гомогенного состояния, однако первые исследования биохимических характеристик фукоиданаз проводились, в основном, на частично очищенных ферментных препаратах с использованием частично очищенных субстратов (фукоиданов).

Как правило, оптимальные значения рН для проявления каталитической активности фукоиданаз бактерий лежат в диапазоне от слабокислой до слабощелочной среды (рН 6–8) (Таблица 1). Самый низкий рН-оптимум (5,5) среди всех охарактеризованных фукоиданаз продемонстрировала фукоиданаза Fun174A из бактерии *Wenyinzhuangia aestuarii* OF219, а самый высокий наблюдался у FFA2 из *Formosa algae* и OUC-FaFcn1 из *Flavobacterium algicola* 12076 (до 9). Примечательно, что оптимальные значения рН фукоиданаз, выделенных из других источников, отличаются. Например, ферменты морских беспозвоночных проявляют наибольшую активность в кислых условиях с рН 3,5–5,5 [33, 40].

Продолжение таблицы 1

Источник	Название фермента	Семейство CAZy	GenBank	Тип действия	Оптимум		Ингибиторы	Активаторы	М, кДа	Ссылка
					Т, °С	рН				
Некультивируемая бактерия	Fp273	GH107	AYC81238.1	эндо / α -1→4	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	96	[48]
Некультивируемая бактерия	Fp277	GH107	AYC81239.1	эндо / α -1→4	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	78	[48]
Некультивируемая бактерия	Fp279	GH107	A0A386CB32	эндо / α -1→4	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	80	[48]
<i>Formosa haliotis</i>	Fhf1Δ470	GH107	WP_066217780.1	эндо / α -1→4	37–40	8,0	н.о.	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺	71	[49]
<i>F. haliotis</i>	Fhf2Δ484	GH107	WP_066217784.1	эндо / α -1→4	35–45	8,0	н.о.	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺	46	[50]
<i>F. algae</i>	FFA1	GH107	WP_057784217.1	эндо / α -1→4	н.о.	6,5–8,0	Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Sn ²⁺ , Fe ³⁺	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	125	[51]
<i>F. algae</i>	FFA2	GH107	WP_057784219.1	эндо / α -1→4	25–37	6,5–9,0	Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Sn ²⁺ , Fe ³⁺	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	101	[52]
<i>F. algicola</i> 12076	OUC-FaFen1	GH107	UZH25096.1	эндо / α -1→4	40	9,0	Na ⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ³⁺	Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	110	[53]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf1	GH107	ANW96097.1	эндо / α -1→4	24–40	6,4–7,2	Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , Co ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺	84	[54]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf2	GH107	ANW96098.1	эндо / α -1→4	24–40	6,0–7,2	Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺	97	[54]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf3	GH107	ANW96115.1	эндо / α -1→4	40–50	6,4–6,8	Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺	Mn ²⁺	100	[55]

Продолжение таблицы 1

Источник	Название фермента	Семейство CAZy	GenBank	Тип действия	Оптимум		Ингибиторы	Активаторы	М, кДа	Ссылка
					Т, °С	рН				
<i>W. fucanilytica</i>	FWf4	GH107	ANW96116.1	эндо / α -1→4	40–50	6,0–6,4	Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Mn ²⁺	81	[55]
<i>Muricauda eckloniae</i>	Mef2	GH107	WP_055392200.1	эндо / α -1→3	35	8,0	н.о.	Ca ²⁺	105	[56]
<i>W. fucanilytica</i>	FunA	GH168	WP_068826898.1	эндо / α -1→3	40	8,0	н.о.	н.о.	48	[57]
<i>W. aestuarii</i> OF219	Fun174A	GH174	UXV25327.1	эндо / α -1→3	30	5,5	Hg ²⁺ , Cu ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	80	[24]
<i>Rubritalea marina</i>	-	GH174	WP_018969589.1	эндо / α -1→3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	[24]
<i>Spartobacteria bacterium</i>	-	GH174	NBS51666.1	эндо / α -1→3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	[24]
<i>W. fucanilytica</i>	-	GH174	WP_068826452.1	эндо / α -1→3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	[24]

Примечание: * – значение молекулярной массы взято из базы данных PDB (шифр 6M8N[A]); н.о. – не определено

Фукоиданазы проявляют максимальную активность в широком диапазоне температур. Так, температурный оптимум фукоиданазы FcnA из морской бактерии *M. fucanivorans* SW5 (20–25 °C) является одним из самых низких. Напротив, ферменты, продуцируемые морской бактерией *Vibrio* sp. No.5, наиболее активны при температуре 38–45 °C. Более того, они способны сохранять активность до 50–60 °C (Таблица 1). Температурный оптимум фукоиданаз беспозвоночных также лежит в области 38–45 °C [22, 40], а для проявления максимальной активности ферментов грибов необходимы еще более высокие температуры от 50 до 60 °C [36, 39].

Наличие ионов некоторых металлов является необходимым условием для совершения каталитического акта множества ферментов. Катионы металлов способны модулировать ферментативную активность большинства известных фукоиданаз семейства GH107 [46, 51, 52]. Например, фукоиданазы из морских бактерий *F. algae* (FFA1 и FFA2) и *F. haliotis* (Fhf1Δ470 и Fhf2Δ484) не проявляют активность без добавления солей некоторых металлов и полностью теряют активность после обработки ЭДТА. Однако есть вероятность, что ЭДТА сам по себе может оказывать ингибирующее действие на активность фукоиданаз. Так, например, фукоиданаз OUC-FaFcn1 из *F. algicola* 12,076 проявляла активность и в отсутствие в реакционной смеси ионов металлов, но теряла активность при добавлении ЭДТА [53]. Важность присутствия некоторых катионов металлов для ферментативного процесса согласуется с информацией об обнаруженных в кристаллических структурах MfFcnA (FcnA) и P5FcnA атомах Ca [47]. Помимо ионов Ca²⁺ активность большинства охарактеризованных фукоиданаз могут усиливать ионы таких двухвалентных металлов, как Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ и в меньшей степени Co²⁺ (Таблица 1). Ионы Al³⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Sn²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ и Zn²⁺, как правило, ингибируют активность этих ферментов. Интересным исключением являются фукоиданазы Fhf1Δ470 и Fhf2Δ484 из *F. haliotis* и фукоиданаз Fda1 из *Alteromonas* sp. SN-1009. В случае с Fhf1Δ470 и Fhf2Δ484 ионы Zn²⁺, Ni²⁺ и Fe²⁺ оказывают усиливающее действие [49, 50]. А ионы Fe³⁺ увеличивают активность Fda1 [41].

Активность эндо-фукоиданаз семейств GH168 и GH174 из морских бактерий *W. fucanilytica* (FunA) и *W. aestuarii* OF219 (Fun174A), напротив, не зависела от присутствия в реакционной смеси катионов мультивалентных металлов, так же, как и активность экзо-фукоиданазы из *Vibriosp.* No.5 (Таблица 1). Вероятно, необходимость в наличии катионов металлов определяется определенной укладкой глобулы фермента.

В присутствии в реакционной смеси NaCl и KCl в концентрациях от 0,1 М до 0,4 М наблюдалось увеличение активности фукоиданазы Fun174A [24]. Фукоиданазы Fhf1Δ470 и Fhf2Δ484 также проявляли активность в присутствии NaCl. Наибольшая активность Fhf2Δ484 достигалась при 100 мМ NaCl, а Fhf1Δ470 при 15–100 мМ, при этом оба фермента сохраняли

активность во всех тестируемых концентрациях до 500 мМ NaCl [49, 50]. Оптимальная концентрация NaCl в реакционной для проявления активности фукоиданазы Fda1 равна 0,4 М [41]. Активатором фукоиданазы из морской бактерии "*F. marina*" также являлся NaCl [45]. SA-0082, а ферментативная активность фукоиданазы FunA из *W. fucanilytica* не зависела от наличия этой соли в реакционной смеси [57].

1.1.4 Субстраты фукоиданаз

Ключевой характеристикой ферментов является их специфичность, изучение которой невозможно без набора структурно разнообразных высокоочищенных субстратов. Субстратами фукоиданаз являются сульфатированные фукозосодержащие полисахариды бурых водорослей – фукоиданы и родственные им фукансульфаты, выделенные из иглокожих. Проблемы, возникающие при использовании фукоиданов для изучения специфичности фукоиданаз, напрямую связаны с затруднениями в установлении структур этих сложных полисахаридов. Тем не менее, ни одно современное исследование фукоидандеградирующих ферментов не обходится без анализа их активности по отношению к фукоиданам, выделенным из различных источников.

1.1.4.1 Фукоиданы. Общие сведения

Бурые водоросли широко распространены в морях Мирового океана и представляют собой богатый возобновляемый источник биологически активных полисахаридов, давно используемых в качестве биологически активных добавок к пище, в медицине, фармакологии и косметологии [58–60]. Среди разнообразия полисахаридов бурых водорослей фукоиданы привлекают особенное внимание и являются объектом интенсивного изучения на протяжении последних 15 лет.

О фукоиданах стало известно более 100 лет назад благодаря работе, опубликованной Х. Килин (H. Kylin) в 1913 г. [61], однако термин «фукоидан» впервые был применён в 1959 г. в трудах У. Х. МакНили (W. H. McNeely) [62]. Фукоиданы представляют собой обширный класс полисахаридов, необходимым, а зачастую и основным компонентом которых являются остатки α -L-фукозы, этерифицированные серной кислотой. В большинстве случаев полисахариды данного класса включают в себя и другие компоненты: остатки галактозы, маннозы, глюкозы, рамнозы, ксилозы и уроновых кислот [63]. При этом содержание фукозы и других моносахаридов, входящих в состав фукоиданов, не является постоянным и варьирует в зависимости от вида бурых водорослей, а также времени и места их сбора [64]. Нерегулярное строение, наличие разветвлений и заместителей, таких как сульфатные и ацетатные группы, разнообразие гликозидных связей также обуславливают сложную организацию этих

полисахаридов. Подобные, но имеющие регулярную и более простую структуру полисахариды были обнаружены в некоторых видах морских беспозвоночных и названы фукансульфатами, поскольку состоят только из остатков сульфатированной фукозы [65–68]. Благодаря успехам в области иммуноферментного анализа с помощью фукоидан-специфических антител были обнаружены эпитопы структур фукоиданов в некоторых губках и головоногих моллюсках [69]. Недавние исследования показали, что некоторые виды диатомовых водорослей также способны продуцировать фукозосодержащие полисахариды, однако их структура остается неизученной [70, 71].

Содержание фукоиданов в бурых водорослях может сильно различаться в зависимости от вида и лежит в пределах от 0,1 до 20,4% от веса сухой обезжиренной водоросли. Наибольшее на сегодняшний день содержание фукоидана (около 20,4%) обнаружено в бурой водоросли *Saundersella simplex* порядка Dictyosiphonales [72]. Высокое содержание фукоидана (до 10,7%) также характерно для бурых водорослей порядка Laminariales и семейства Fucaceae порядка Fucales. Значительно меньшее количество фукоиданов (до 1,4%) продуцируют водоросли семейства Sargassaceae порядка Fucales [64].

Фукоиданы в основном локализируются во внеклеточном матриксе и клеточных стенках бурых водорослей, а также в слизистых каналах на поверхности их слоевищ. Стоит отметить, что фукозосодержащие полисахариды присутствуют во всех клеточных структурах бурых водорослей и особенно многочисленны в сердцевидном слое [73, 74]. При этом фукоиданы, локализованные в различных клеточных структурах водоросли, по-видимому, имеют свои структурные особенности [75]. Основными подтвержденными функциями фукоиданов являются участие в построении клеточных стенок, обеспечении их стабильности, облегчении экстрюзии спор и гамет из репродуктивных органов водорослей, осморегуляции в клетках в условиях солевого стресса. Роль фукоиданов в обмене активного кислорода и защите водорослей от высыхания во время отливов требует экспериментального подтверждения [74].

1.1.4.2 Номенклатура и классификация фукоиданов

Общепринятой номенклатуры фукоиданов до сих пор не существует, и термин «фукоидан» используется для описания большого количества структурно разнообразных сульфатированных, а иногда и ацетилированных, гомо- и гетерополисахаридов. Это, в свою очередь, нередко приводит к путанице, поскольку единое обозначение этих полисахаридов невозможно из-за различий в их молекулярной структуре и вариативности моносахаридного состава, которые часто зависят от множества эндо- и экзогенных факторов [15, 76, 77]. Термин «фукоидан» используется для обозначения фуканов или фукозосодержащих полисахаридов, экстрагированных из бурых водорослей, в то время как термин «сульфатированный фукан»

относится к полисахаридам, выделенным из морских беспозвоночных [78]. В соответствии с рекомендациями IUPAC «сульфатированный фукан» определяют как полисахарид, построенный главным образом из остатков сульфатированной L-фукозы, содержание других моносахаридных остатков в котором менее 10%.

Примечательно, что препараты фукоиданов, полученные в период ранних исследований, содержали большое количество примесей других углеводов и даже белков. В связи с этим нельзя было достоверно установить, были ли некоторые структурные фрагменты примесями или же являлись частью полисахарида. По мере совершенствования методов разделения и анализа в препаратах фукоиданов стали различать разные типы фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов, которым давали названия по названию рода водоросли, из которой они были выделены. Первым был «аскофиллан» – сульфатированный ксилофукоглюкуронан, выделенный из бурой водоросли *Ascophyllum nodosum*. Основная цепь этого полисахарида построена преимущественно из остатков глюкуроновой кислоты с ответвлениями, содержащими фукозу и ксилозу (3-O- β -D-ксилопиранозил-L-фукозу) [73, 79]. Позднее был выделен «саргассан», цепь которого построена из остатков D-галактозы и имеет ответвления в виде L-фукозо-3-сульфата или иногда уроновой кислоты [80, 81]. В настоящее время такая классификация используется редко.

По мере роста численности публикаций, посвященных установлению строения фукоиданов, и, соответственно, накопления знаний об их структурных особенностях появилась необходимость создания классификации данных полисахаридов для упорядочения их структурного разнообразия. Так, Звягинцева Т. Н. и др. предложили разделить фукоиданы на группы по их моносахаридному составу. Согласно предложенной классификации, молекулы фукоиданов могут состоять: главным образом из остатков фукозы и сульфатов (сульфатированные α -L-фуканы); из остатков фукозы, галактозы и сульфатных групп (галактофуканы (реже фукогалактаны)); из остатков фукозы, маннозы, уроновых кислот и сульфатных групп (фукоглюкурономаннаны (реже глюкуронофуканы/фукоглюкуронаны)); а также из остатков фукозы, галактозы, маннозы, ксилозы, глюкозы, арабинозы, уроновых кислот и сульфатных групп (более сложные гетерополисахариды). Сульфатированные α -L-фуканы авторы предлагают дополнительно классифицировать по типу основной цепи (1 \rightarrow 3- α -L-фуканы и 1 \rightarrow 3-;1 \rightarrow 4- α -L-фуканы) (Рисунок 2) [64]. Стоит отметить, что некоторые фукоиданы содержат ацетильные группы; также молекулы фукоиданов зачастую сильно разветвлены. Нередко фукоиданы, выделенные из одной и той же водоросли, могут представлять собой смесь полианионных молекул разного строения, не разделяющихся в условиях выбранной схемы разделения [64].

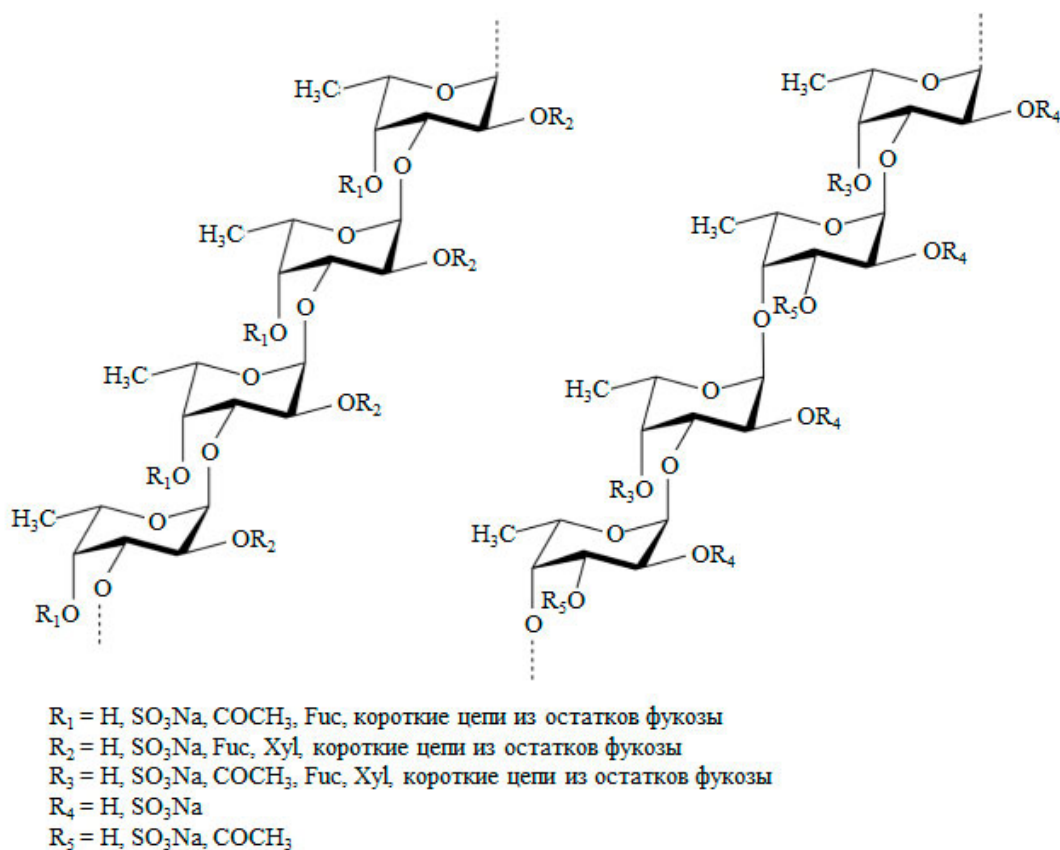


Рисунок 2 – Основные типы структур фуканов бурых водорослей

1.1.4.3 Особенности строения фукоиданов

На моносахаридный состав, молекулярную массу, степень разветвленности, характер сульфатирования и ацетилирования фукоиданов влияет множество факторов, таких как таксономическое положение водорослей, стадия их развития, сезон и место сбора, а также условия экстракции и др. [15–17].

Для установления строения этих полисахаридов используются все известные в настоящее время методы химии углеводов: полный, частичный и ферментативный гидролиз, автогидролиз, периодатное окисление, деградация по Смиуту, восстановление карбоксильных групп, метилирование, дезацетилирование, десульфатирование и др. Также активно применяются физико-химические методы: ИК- и ЯМР-спектроскопия – для установления структур нативных фукоиданов и их модифицированных производных, в том числе олигосахаридов; масс-спектрометрия – для изучения низкомолекулярных фрагментов фукоиданов. Применение этих методов подробно описано в нескольких обзорах и статьях [17, 82–87].

На сегодняшний день фукоиданы были выделены более чем из 60 видов бурых водорослей и частично или подробно охарактеризованы. Наиболее хорошо изучены 1→3- α -L-фуканы (главная цепь состоит из 1→3-связанных остатков α -L-фукопиранозы), 1→3;1→4- α -L-фуканы (главная цепь состоит из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков α -L-

фукопиранозы) и сульфатированные галактофуканы (главная цепь состоит из 1→3- и/или 1→4-связанных остатков α -L-фукопиранозы и/или D-галактопиранозы) [64].

1→3- α -L-Фуканы в основном были обнаружены в бурых водорослях порядка Laminariales и реже встречаются в водорослях порядков Ectocarpales, Chordales, Fucales и Ralfsiales. 1→3;1→4- α -L-Фуканы были получены главным образом из водорослей порядка Fucales и только из одного представителя водорослей порядка Dictyotales. Большинство сульфатированных галактофуканов было выделено из бурых водорослей порядка Laminariales и Fucales, несколько из Dictyotales и Dictyosiphonales. Фукоиданы более сложного состава встречаются в водорослях порядков Fucales, Laminariales, Dictyotales и Ectocarpales. Структурные характеристики известных фукоиданов были собраны и систематизированы в недавнем обзоре Звягинцевой Т. Н. и др. [64].

Как уже было отмечено, для исследования специфичности ферментов в качестве субстратов используют фукоиданы, структурно различающиеся между собой. Наиболее часто активность ферментов тестируют по отношению к фукоидану из *Fucus vesiculosus* порядка Fucales, поскольку это первый коммерчески доступный фукоидан. Известно, что его углеводная цепь содержит повторяющийся структурный мотив, состоящий из остатков L-фукозы, связанных чередующимися α -1→3- и α -1→4-гликозидными связями, а сульфатные группы расположены в C2 и в меньшей степени в C3 положениях остатков L-фукозы [88]. Примерами других полисахаридов, широко используемых для изучения фукоидандеградирующих ферментов, могут служить фукоиданы из бурых водорослей *F. evanescens*, *Saccharina cichorioides*, *Sargassum horneri*, *Undaria pinnatifida* и др.

Фукоидан из *F. evanescens* (порядок Fucales) построен из остатков α -L-фукозы, связанных чередующимися α -1→3 и α -1→4-гликозидными связями. В работе Билан М. И. и др. сообщалось, что он имеет линейную структуру, часть остатков L-фукозы ацетилирована, а сульфатные группы располагаются преимущественно в C2 положениях остатков L-фукозы и в небольших количествах в C4 [89]. Другая группа исследователей выделила фракцию структурно отличающегося фукоидана из того же вида водоросли. Было показано, что в цепи количество α -1→3-связанных остатков фукозы сильно преобладает над количеством α -1→4-связанных [90]. Особенности структуры фукоидана из *F. evanescens* также были исследованы ферментативными методами. В результате ферментативной деполимеризации фукоидана из *F. evanescens* были получены фукоолигосахариды, структурное исследование которых позволило предположить, что нативный фукан имел небольшое количество (около 2%) разветвлений при C4 α -1→3-связанных остатков основной цепи [40].

С помощью ЯМР-спектроскопии была установлена структура основной цепи фукоидана, выделенного из *S. horneri* (порядок Fucales). Было показано, что она построена из

повторяющихся фрагментов 1→3-;1→4-связанной α -L-фукозы, сульфатированной при C2 или C2 и C3 положениях. Полученная фракция фукоидана характеризовалась высокой степенью разветвленности, боковые цепи были присоединены к основной цепи в положении C4 и содержали фрагменты, построенные из несulfатированных 1→2-связанных остатков α -L-фукозы или 1→3-связанных остатков α -L-фукозы с сульфатированием при C4 [91]. Ранее фракция фукоидана из *S. horneri*, содержащая подобные структурные фрагменты, была получена С. Припреймом (S. Preeprame) и др. и охарактеризована с помощью анализа метилирования. Сульфатные группы были расположены в C2 или C4 положениях при остатках 1→3-связанной α -L-фукозы, а также в C3 положении при 1→2- и 1→4-связанных остатках α -L-фукозы [92]. Другими авторами был получен высокосulfатированный фукоидан со значительным содержанием маннозы [93].

Из бурой водоросли *U. pinnatifida* (порядок Laminariales) разными исследовательскими группами было выделено несколько фракций фукоиданов, отличающихся структурными характеристиками. Так, галактофукан, содержащий остатки β -D-галактозы и 2-O-сульфатированной 1→3-связанной α -L-фукозы примерно в равных количествах, а также следовые количества ксилозы и маннозы, был выделен А. Синицей (А. Synytsya) и др. [94]. Сульфатированный галактофукан, содержащий небольшое количество уроновой кислоты и построенный преимущественно из остатков 1→3-связанной α -L-фукозы, 1→3-связанной β -D-галактозы, β -D-1→4-связанной галактозы и β -D-1→6-связанной галактозы, был получен Дж. Лии (J. Lee) и др. [95]. Большое количество остатков уроновой кислоты вместе с нейтральными сахарами содержал галактофукан, выделенный Ю. Жао (Y. Zhao) и др. [96]. Расположение сульфатных групп удалось установить для фукоидана, выделенного Дж. А. Хеммингсоном (J. A. Hemmingson) и др., основным компонентом этого галактофукана являлись α -1→3-связанные остатки L-фукозы, сульфатированной в C2 и C4 положениях. Остатки α -1→3-связанной L-фукозы с сульфатными группами только при C2, несulfатированные 1→3-связанные остатки β -D-галактозы, а также остатки 1→4-связанной или 1→6-связанной β -D-галактозы с сульфатными группами в положении C3 присутствовали в меньших количествах [97]. α -L-Фуканы среди фракций фукоиданов, выделенных из бурой водоросли *U. pinnatifida*, не были обнаружены. Все описанные галактофуканы были выделены из бурых водорослей *U. pinnatifida*, собранных в разных регионах России, Южной Кореи, Японии, Австралии, Новой Зеландии и др., чем, вероятно, обусловлено такое структурное разнообразие этих полисахаридов.

Фракция фукоидана, выделенная из бурой водоросли *S. cichorioides* (ранее *Laminaria cichorioides*) порядка Laminariales, представляла собой высокосulfатированный полисахарид, построенный из остатков α -L-фукозы, связанных в основном α -1→3-гликозидными связями.

Небольшое количество 1→4-связанной α -L-фукозы присутствовало в цепи полисахарида. Практически все остатки L-фукозы в цепи имели сульфатные группы в C2 и C4 положениях [16]. Фракция фукоидана из *S. cichorioides*, полученная другими авторами, представляла собой сульфатированный галактофукан, преобладающим структурным компонентом которого являлись повторяющиеся звенья из 1→4-связанных остатков α -L-фукозы, сульфатированных в C2 и C3 положениях [98].

Таким образом, структурное разнообразие фукоиданов достаточно велико, что позволяет их широко использовать в качестве субстратов различного строения для исследования детальной специфичности фукоидандеградирующих ферментов.

1.1.4.4 Биологическая активность фукоиданов

Многочисленные исследования фукоиданов за последние 10–15 лет продемонстрировали широкий спектр их биологической активности и возможностей их приложений в биомедицине. Так, биологические испытания *in vitro* и *in vivo* с использованием разных моделей (раковых клеток и животных) показали высокий потенциал фукоиданов из различных видов водорослей как противоопухолевых агентов [99, 100]. Доказано, что фукоиданы способны снижать пролиферацию опухолевых клеток [10] и их способность к метастазированию [11, 12], а также стимулировать апоптоз клеток [13, 14]. Немногочисленные исследования, выполненные при лечении неоперабельных онкологических больных, показали, что эффективность лечения, совмещающего применение фукоидана и комплексной химиотерапии, была значительно выше, чем эффективность лечения пациентов, проходивших только химиотерапию [101].

Часто влияние фукоиданов на развитие и распространение злокачественных образований связывают с их способностью проявлять другие виды активности, например, противовоспалительную и иммуномодулирующую. Развитие опухолей зачастую сопровождается воспалительными процессами, а иногда хронические воспаления являются одной из причин возникновения онкологических заболеваний [102]. Большое число исследований свидетельствует о способности фукоиданов влиять на экспрессию некоторых медиаторов воспаления, секрецию интерлейкинов, а также подавлять передачу сигналов по путям сигнальной трансдукции, участвующим в воспалительных процессах [103]. Кроме того, известно, что эти сульфатированные полисахариды способны связываться с P-селектинами на поверхности тромбоцитов и эндотелиальных клеток, предотвращая их связывание с природными лигандами [104]. Опосредованное действие фукоиданов на развитие опухолей также может осуществляться за счет стимулирования иммунитета [105].

Большое число исследований свидетельствует о наличии противовирусной активности фукоиданов относительно вирусов гриппа [106, 107], герпеса [108], табачной мозаики [109],

вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [110, 111] и даже SARS-CoV-2 [112, 113]. В ряде исследований говорится о стимулирующем действии фукоидана на выработку антител к вирусу гепатита В [114]. Предполагается, что фукоиданы могут препятствовать проникновению вирусов в клетки за счет изменения свойств поверхности клеток, хотя возможно и непосредственное взаимодействие полисахаридов с белками оболочки или ферментами вирусов.

Несколько научных работ было посвящено изучению антимикробного и противогрибкового действия фукоиданов. Например, было продемонстрировано эффективное действие фукоиданов из некоторых видов бурых водорослей против патогенов полости рта *Streptococcus mutans* и *Porphyromonas gingivalis*. В отношении *Candida albicans* исследуемые авторами фукоиданы проявляли активность, сравнимую с флуконазолом [115].

В зависимости от молекулярной массы, степени сульфатирования, разветвленности полисахарида и других особенностей строения, фукоиданы могут проявлять как антикоагулянтные [116], так и прокоагулянтные свойства [117, 118]. В настоящий момент результаты научных исследований по данному направлению сильно разнятся, и четкие закономерности не выявлены.

Отмечается, что фукоиданы как в нативном виде, так и их химически модифицированные производные (например, аминированные и фосфорилированные) проявляют антиоксидантные свойства [7]. Однако полностью механизм проявления антиоксидантных свойств фукоиданами пока не установлен.

Упоминалось, что фукоиданы могут быть кандидатами в качестве нейропротекторного средства для борьбы с болезнями Альцгеймера и Паркинсона [6]. Исследование, проведенное с использованием 16 различных сульфатированных полисахаридов показало, что сульфатированный галактофукан и сульфатированный фукоглюкурономаннан проявляют высокое сродство к тау-белку. Аффинность этих полисахаридов к тау-белку значительно превышала таковую у гепарина. Таким образом, фукоиданы потенциально могут предотвращать гепарансульфатопосредованное распространение и агрегацию тау-белка, протекающее на ранних стадиях развития болезни Альцгеймера [119]. Однако данное направление исследований только развивается, и пока еще проведено недостаточное число исследований, позволяющих оценить реальный потенциал фукоиданов в борьбе с этими заболеваниями.

Таким образом, многочисленные исследования биологических свойств фукоиданов демонстрируют их высокий потенциал для использования в качестве БАД или лекарственных средств с целью снижения риска множества заболеваний.

1.1.5 Анализ ферментативной активности фукоиданаз

Наиболее часто используемые методы для детектирования активности О-гликозидгидролаз основаны на определении расщепленных О-гликозидных связей в субстрате путем спектрофотометрического измерения количества восстанавливающих сахаров, образующихся во время ферментативного гидролиза. Среди них наиболее известны метод Нельсона-Сомоджи [120, 121], методы, основанные на реакциях с динитросалициловой кислотой [122] или пара-гидроксибензойной кислотой [123]. Реже используют феррицианидный [124] и бицинхониатный методы [125]. К сожалению, данные колориметрические методы оказываются малоэффективными в случае расщепления ферментами небольшого числа О-гликозидных связей в молекулах полисахарида. При анализе гидролитического расщепления фукоиданов данные методы, как правило, также оказываются малопригодными [30, 126]. Вероятно, на восстанавливающую способность образующихся продуктов реакции при гидролизе фукоиданов оказывает влияние определенное расположение сульфатных групп при остатках фукозы.

Многие физико-химические методы, используемые для определения активности ферментов, также имеют ряд ограничений для их применения, когда субстратом является фукоидан. Например, методы вискозиметрии, позволяющие получить количественные характеристики активности О-гликозидгидролаз [127], требуют высокой концентрации субстрата, необходимого для приготовления вязких растворов. Однако при высокой концентрации фукоидана в реакционной смеси может происходить ингибирование активности фукоиданаз. Кроме того, вискозиметрические методы требуют приготовления реакционных смесей большого объема, что подразумевает большой расход субстрата.

В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) является наиболее используемым для анализа фукоиданазной активности [49–52, 128]. Метод является чувствительным и основан на разделении продуктов ферментативного гидролиза фукоидана (сульфатированных поли- и олигосахаридов) в полиакриламидном геле высокой плотности (обычно 20%) в соответствии с их электрофоретической подвижностью, зависящей от их масс и заряда. За счет использования красителей, специфичных к полианионным поли- и олигосахаридам, данный метод подходит как для анализа активности очищенных ферментов, так и для детектирования фукоиданазной активности в клеточных экстрактах различных организмов. Недостатком метода является отсутствие возможности достоверно оценивать количество расщепленных О-гликозидных связей, что затрудняет исследование кинетических параметров ферментативной реакции.

Для получения количественных данных при мониторинге деполимеризации полисахаридов может быть использована гельпроникающая хроматография. Метод основан на

разделении молекул по размеру. Поэтому для деполимеризации полисахарида экзо-ферментами, приводящей к едва заметному снижению молекулярной массы, этот метод может оказаться менее подходящим [129]. Главным недостатком метода можно считать невысокую скорость проведения анализа для большого количества образцов.

Для поиска фукоиданазной активности в бактериальных колониях был предложен метод с использованием агаровой питательной среды с добавлением фукоидана. Колонии выращивались в чашках Петри на поверхности агара, после чего их удаляли, а агар обрабатывали цетилтриметиламмонийбромидом. Среда на месте колоний, содержащая недеградированный фукоидан, имела фон молочно-белого цвета, а участки с деполимеризованным фукоиданом визуализировались в виде прозрачного гало [126].

1.1.6 Тип действия и специфичность фукоиданаз

Определение субстратной специфичности О-гликозидгидролаз подразумевает: идентификацию природного субстрата; определение, каким образом фермент действует на молекулу субстрата; какой тип гликозидных связей и между какими моносахаридами подвергается ферментативному гидролизу; как влияют углеводные и неуглеводные заместители, присутствующие в субстрате, на способность фермента к гидролизу этих О-гликозидных связей.

Исследование детальной специфичности фукоиданаз является чрезвычайно трудной задачей, поскольку их субстратами являются полисахариды, поражающие разнообразием строения. Нередко отсутствие большого набора высокоочищенных структурно разнообразных субстратов становится препятствием для установления специфичности этих ферментов.

Известно, что гликозидгидролазы отличаются типом (или способом) действия на субстрат и могут являться ферментами либо экзо- либо эндо-типа. Действующие по экзо-типу фукоиданазы осуществляют деградацию фукоидана путем отщепления одного продукта, обычно моно- или дисахарида, с невозстанавливаемого конца молекулы субстрата. Эндо-фукоиданазы катализируют гидролиз гликозидных связей внутри полимерной цепи фукоидана, образуя на ранних этапах гидролиза продукты с различной степенью полимеризации.

Большинство известных фукоиданаз являются ферментами эндо-типа действия. На сегодняшний день в литературе имеется информация только о четырех фукоиданазах, действующих на субстрат по экзо-типу (Таблица 2). Три из них были выделены из морской бактерии *Vibrio* sp. No.5 [27] и одна из морского ежа *Strongylocentrotus nudus* [33].

Таблица 2 – Специфичность и тип действия известных фукоидаз

Продуцент	Название фермента	Семейство CAZy	Источник субстрата	Основные структурные фрагменты субстрата	Структура продуктов	Тип действия, расщепляемая связь	Ссылка
Бактериальные источники							
<i>Vibrio</i> sp. No.5	E-1 E-2 E-3	-	<i>Saccharina sculpera</i> (<i>Kjellmaniella crassifolia</i>)	[3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→] ответвление: α -L-Fucp-1→2	Сульфатированная фукоза и/или сульфатированная фукобиоза	Экзо-тип	[27]
<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	Fda1 и Fda2	GH107	<i>S. sculpera</i> (<i>K. crassifolia</i>)	[3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→] ответвление: α -L-Fucp-1→2	α -1→3- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→3	[41, 42]
			<i>S. cichoriodes</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3- связанные сульфатированные фукоолигосахариды		[128]
			<i>Sargassum mcclurei</i>	Галактофукан сложного состава	сульфатированные олигосахариды		
			<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды		
			<i>F. vesiculosus</i>	-	α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды		
			<i>U. pinnatifida</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→]; [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→] ответвление: β -D-Galp-1→4	сульфатированные фукоолигосахариды		
			<i>Turbinaria ornata</i>	Галактофукан сложного строения	сульфатированные фукоолигосахариды		
<i>P. citrea</i> KMM 3296, KMM 3297, KMM 3298	-	-	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→3	[43]

Продолжение таблицы 2

Продуцент	Название фермента	Семейство CAZy	Источник субстрата	Основные структурные фрагменты субстрата	Структура продуктов	Тип действия, расщепляемая связь	Ссылка
			<i>S. cichoriodes</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3- связанные сульфатированные фукоолигосахариды		
<i>S. paucimobilis</i> PF-1	-	-	<i>U. pinnatifida</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→]; [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→] ответвление: β -D-Galp-1→4	сульфатированные олигосахариды	Эндо-тип	[44]
<i>Fucophilus fucoidanolyticus</i> SI-1234	-	-	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	[3- α -L-Fucp-(4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(4OSO ₃ ⁻)-1→] ₄ ответвление: β -D-GlcUA-1→2	α -1→3- связанные сульфатированные фукоолигосахариды, содержащие ответвления GlcUA-1→2	Эндо-тип, α -1→3	[130]
" <i>F. marina</i> " SA-0082	SFGM лиаза (FdlA)	-	<i>S. sculpera</i> (<i>K. crassifolia</i>)	F: [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→] U: [4- β -D-GlcUA-1→2- β -D-Manp-1→] ответвление: α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→3	сульфатированные ненасыщенные фукоглюкуроманно-олигосахариды	Эндо-тип, β -1→4 гликозидная связь между остатками GlcUA и Manp (фукоглюкороманнан лиаза)	[131]
<i>M. fucanivorans</i> SW5	FcnA	GH107	<i>Pelvetia canaliculata</i>	[3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[46]
<i>Flavobacteriaceae</i> CZ1127	-	-	<i>Acaudina malpadioides</i>	[3- α -L-Fucp-1→3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→3	[132]
<i>Psychromonas</i> sp. SW5A	P5AFcnA	GH107	<i>Laminaria hyperborea</i> <i>Macrocystis pyrifera</i>	-	олигосахариды	Эндо-тип	[47]

Продолжение таблицы 2

Продуцент	Название фермента	Семейство CAZy	Источник субстрата	Основные структурные фрагменты субстрата	Структура продуктов	Тип действия, расщепляемая связь	Ссылка
<i>Psychromonas</i> sp. SW19D	P19DFcnA	GH107	<i>L. hyperborean</i> <i>M. pyrifer</i>	-	олигосахариды	Эндо-тип	[47]
Некультивируемая бактерия	Fp273	GH107	<i>P. canaliculata</i>	[3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[48]
	Fp277						
	Fp279						
<i>F. haliotis</i>	Fhf1Δ470	GH107	<i>F. evanescens</i>	[→3- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→]; [→3- α -L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[49]
<i>F. haliotis</i>	Fhf2Δ484	GH107	<i>F. evanescens</i>	[→3- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→]; [→3- α -L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[50]
<i>F. algae</i>	FFA1	GH107	<i>S. horneri</i>	[→3- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2,3SO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся фрагменты со вставками [→3- α -L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→] ответвление: α -L-Fucp-1→2- α -L-Fucp-1→4	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[51]
<i>F. algae</i>	FFA2	GH107	<i>F. evanescens</i>	[→3- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→]; [→3- α -L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[52]

Продолжение таблицы 2

Продуцент	Название фермента	Семейство CAZy	Источник субстрата	Основные структурные фрагменты субстрата	Структура продуктов	Тип действия, расщепляемая связь	Ссылка
<i>F. algicola</i> 12076	OUC-FaFcn1	GH107	фукоидан порядка Fucales	-	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[53]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf1	GH107	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]; [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α - L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[54]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf2	GH107	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]; [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α - L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[54]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf3	GH107	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]; [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α - L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[55]
<i>W. fucanilytica</i>	FWf4	GH107	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]; [3- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→4- α - L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[55]
<i>M. eckloniae</i>	Mef2	GH107	<i>Saccharina latissima</i>	[3- α -L-Fucp-(4OSO ₃ ⁻)-1→3- α - L-Fucp-(4OSO ₃ ⁻)-1→] ответвление: α -L-Fucp-1→2	α -1→3-связанные сульфатированные фукоолигосахариды, некоторые содержали разветвление α -L-Fucp- (4OSO ₃ ⁻)-1→4	Эндо-тип, α -1→3	[56]
			<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4- связанные сульфатированные фукоолигосахариды		

Продолжение таблицы 2

Продуцент	Название фермента	Семейство CAZy	Источник субстрата	Основные структурные фрагменты субстрата	Структура продуктов	Тип действия, расщепляемая связь	Ссылка
<i>W. fucanilytica</i>	FunA	GH168	<i>Isostichopus badionotus</i>	[3- α -L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3-связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→3	[57]
<i>W. aestuarii</i> OF219	Fun174A	GH174	<i>I. badionotus</i>	[3- α -L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-1→] повторяющиеся фрагменты	α -1→3-связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→3	[24]
<i>R. marina</i>	-	GH174	<i>I. badionotus</i>	[3- α -L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-1→] повторяющиеся фрагменты	-	Эндо-тип, α -1→3	[24]
<i>S. bacterium</i>	-	GH174	<i>I. badionotus</i>	[3- α -L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-1→] повторяющиеся фрагменты	-	Эндо-тип, α -1→3	[24]
<i>W. fucanilytica</i>	-	GH174	<i>I. badionotus</i>	[3- α -L-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp(2OSO ₃ ⁻)-1→3- α -L-Fucp-1→] повторяющиеся фрагменты	-	Эндо-тип, α -1→3	[24]
Беспозвоночные							
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	-	-	<i>Nemacystus decipiens</i>	-	сульфатированные олигосахариды	Эндо-тип	[133]
<i>Haliotus</i> sp.	-	-	<i>F. gardneri</i>	-	олигосахариды	Эндо-тип	[22]

Продолжение таблицы 2

Продуцент	Название фермента	Семейство CAZy	Источник субстрата	Основные структурные фрагменты субстрата	Структура продуктов	Тип действия, расщепляемая связь	Ссылка
<i>Littorina sitkana</i>	-	-	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3, α -1→4-связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→3	[35, 90]
	-		<i>Fucus distichus</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2,3OSO ₃ ⁻)-1→] повторяющиеся единицы			[134]
<i>S. nudus</i>	-	-	<i>F. vesiculosus</i>	производное 2-сульфо- α -L-фукопиранозил-(1→2) - пиридиламинид-фукоза	2-сульфо- α -L-фукопираноза	Экзо-тип, α -1→2	[33]
<i>Lambis</i> sp.	-	-	<i>F. evanescens</i>	[3- α -L-Fucp-(2,4OSO ₃ ⁻)-1→4- α -L-Fucp-(2OSO ₃ ⁻)-1→]	α -1→3-, α -1→4-связанные сульфатированные фукоолигосахариды	Эндо-тип, α -1→4	[40]
Грибы							
<i>D. arenaria</i> TM94	E1	-	<i>F. vesiculosus</i>	-	олигосахариды	Эндо-тип	[39]
			<i>Laminaria digitata</i>				
<i>Fusarium</i> LD8	E2	-	<i>F. vesiculosus</i>	-	олигосахариды	Эндо-тип	[36]

Выводы о субстратной специфичности и типе действия трех фукоиданаз, выделенных из *Vibrio* sp. No.5, были сделаны на основании анализа их действия на фукоидан из бурой водорослей *S. sculpera*. В результате действия ферментов происходило образование продуктов – сульфатированных моносахаридов фукозы и фукобиозы, что характерно для экзо-ферментов [27]. Другая экзо-фукоиданаза, выделенная из пищеварительной системы *S. nudus*, катализировала отщепление 2-О-сульфатированной фукопиранозы от синтетического субстрата – 2-О-сульфо- α -L-фукопиранозил-(1 \rightarrow 2)-пиридиламинофукозы [33].

Первая эндо-фукоиданаза была выделена из гепатопанкреаса морского моллюска *Haliotis* sp. Фермент катализировал гидролиз фукоидана из *F. gardneri* [22]. К сожалению, авторы не привели информации о структурных характеристиках использованного в работе субстрата, поэтому выводы о субстратной специфичности фермента сделать затруднительно. Известно только, что при ферментативном гидролизе субстрата образовывались сульфатированные олигосахариды с различной молекулярной массой. Не много известно и о специфичности эндо-фукоиданазы из гребешка приморского *M. yessoensis*, авторы исследования продемонстрировали ее способность деполимеризовать фукоидан из *N. decipiens* с образованием низкомолекулярных сульфатированных олигосахаридов [133].

Из брюхоногого моллюска *L. sitkana* было выделено две фукоиданазы, отличающиеся по биохимическим свойствам и субстратной специфичности. Фукоиданаза, проявляющая активность в щелочных условиях (рН-оптимум 8,5), деполимеризовала фукоидан из *F. evanescens* с образованием сульфатированных олигосахаридов в три раза эффективнее, чем фукоиданаза, рН-оптимум которой лежал в кислом диапазоне (рН 5,4). А при расщеплении фукоидана из *S. cichorioides* «кислой» фукоиданазой образовывалось в три раза меньше продуктов гидролиза, чем при ее действии на фукоидан из *F. evanescens* [35]. При дальнейших исследованиях были выделены продукты гидролиза фукоидана из *F. evanescens* [90]. В полученных продуктах гидролиза преобладали α -1 \rightarrow 4-связи, тогда как в использованном в качестве субстрата фукоидане α -1 \rightarrow 3-связей было обнаружено в 3,5 раза больше. Кроме того, ферментативному гидролизу подвергался 1 \rightarrow 3-связанный α -L-фукан из *S. cichorioides*, что также доказывало специфичность исследуемых ферментов к гидролизу α -1 \rightarrow 3-гликозидных связей. Активная в кислых условиях фукоиданаза действовала на фукоидан из *F. distichus* с образованием высокомолекулярных продуктов, основным из которых являлся полисахарид, структурно подобный исходному фукоидану, построенный из повторяющихся фрагментов [\rightarrow 3- α -L-Fucp-(2,4OSO₃⁻)-1 \rightarrow 4- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow]. В качестве минорного продукта ферментативной реакции был выделен полисахарид схожего строения основной цепи, но содержащий дополнительные ацетатные группы в С3 и С4, а сульфатные группы в С2 положениях при остатках α -L-фукозы [134]. Авторы предположили, что фермент катализировал

гидролиз гликозидных связей между остатками фукозы, лишенными заместителей, которые были обнаружены в исходном фукоидане в небольших количествах.

Эндо-1→4- α -L-фукоиданаза была выделена из морского брюхоногого моллюска *Lambis* sp. Данный фермент катализировал гидролиз 1→3-;1→4- α -L-фуканов, выделенных из *F. evanescens* и *F. vesiculosus*, но не 1→3- α -L-фукана из *S. cichorioides* [40]. В результате ферментативного гидролиза фукоидана из *F. evanescens* были получены сульфатированные олигосахариды с разной степенью полимеризации. Исследование структур этих олигосахаридов показало, что все олигосахариды сульфатированы только в C2 положениях при остатках α -L-фукозы, что позволило авторам сделать вывод о субстратной специфичности данного фермента. Таким образом было обнаружено, что фукоидан из *F. evanescens* имеет протяженные фрагменты, сульфатированные только в C2 положениях, и фукоиданаза из *Lambis* sp. обладает специфичностью к таким фрагментам.

Эндо-фукоиданазы, выделенные из морских грибов *D. arenaria* TM94 [39] и *Fusarium* LD8 [36], были активны по отношению к фукоидану из *F. vesiculosus*, структурных характеристик которого авторы исследований не приводили. В результате действия этих фукоиданаз происходило образование низкомолекулярных фукоолигосахаридов. Фукоидан из *Laminaria* sp. гидролизировался фукоиданазой из *D. arenaria* TM94 менее эффективно.

Исследование структур олигосахаридов, полученных в результате действия фукоиданаз бактериального штамма *Alteromonas* sp. SN-1009 на фукоидан из *S. sculpera*, показало, что эти ферменты являются эндо-1→3- α -L-фукоиданазами [42]. Протеобактерия *P. citrea* (штаммы KMM 3296, KMM 3297, KMM 3298) продуцировала фукоиданазы такого же типа. Они расщепляли α -1→3-гликозидные связи в молекулах фукоиданов из бурых водорослей *S. cichorioides* и *F. evanescens*. При этом бактериальные штаммы деполимеризовали субстраты с разной эффективностью [43]. Еще одна эндо-1→3- α -L-фукоиданаза была обнаружена в морской бактерии *F. fucoidanolyticus* SI-1234. Выводы о ее субстратной специфичности были сделаны после выделения и подробного изучения структуры продуктов гидролиза фукоидана из *S. okamuranus* [130]. Подобной специфичностью обладала фукоиданаза из бактериального штамма *Flavobacteriaceae* CZ1127. Продукты ферментативного действия фукоиданазы на фукансульфат из *A. molpadioides* были структурно охарактеризованы. Полученные данные показали, что основным структурным фрагментом фукоидана из *A. molpadioides* является дисахаридное звено [\rightarrow 3- α -L-Fucp-1→3- α -L-Fucp-(2,4OSO₃⁻)-1→], а сам фермент катализировал гидролиз α -1→3-гликозидных связей [132].

Среди представителей 107 семейства гликозидгидролаз (GH107) три фукоиданазы (Fda1, Fda2 и Mef2) были охарактеризованы как ферменты эндо-типа действия, катализирующие расщепление α -1→3-гликозидных связей. Фукоиданазы Fda1 и Fda2, обнаруженные в морской

бактерии *Alteromonas* sp. SN-1009, катализировали гидролиз фукоидана из *S. sculpera* (*K. crassifolia*) [41, 42] и проявляли невысокую активность по отношению к фукоиданам из *S. cichoriodes* и *U. pinnatifida* [128]. Известно, что эти фукоиданы являются 1→3-связанными α -L-фуканами. Фукоиданы из бурых водорослей *F. evanescens* и *F. vesiculosus*, построенные из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков сульфатированной α -L-фукозы, также ограниченно подвергались гидролизу с помощью Fda1 и Fda2 [128]. Галактофукан, выделенный из бурой водоросли *T. ornata*, основная цепь которого состоит из 1→3-связанных сульфатированных в C2 и в меньшей степени в C4 положениях остатков α -L-фукозы, и имеющий ответвления, состоящие из остатков β -D-галактозы в соотношении Fuc:Gal \approx 3:1, слабо расщеплялся фукоиданазами. Наиболее высокую активность эти фукоиданазы проявляли по отношению к галактофукану сложного строения из *S. mcclurei* [128]. Известно, что данный фукоидан содержит как 1→3- так и 1→4-связанные сульфатированные остатки α -L-фукозы, остатки β -D-галактозы, связанные с остатками α -L-фукозы β -1→3-О-гликозидными связями, и остатки α -L-фукозы, связанные с остатками β -D-галактозы α -1→6-О-гликозидными связями на восстанавливающем конце углеводной цепи полисахарида. Сульфатные группы расположены, как правило, в C2 и/или C4 положениях при остатках α -L-фукозы и иногда в положении C6 при остатках β -D-галактозы.

Фукоиданаза Mef2, выделенная из морской бактерии *M. eckloniae* [56], проявляла активность по отношению к фукоидану из *F. evanescens*, построенному из чередующихся 1→3- и 1→4-связанных остатков сульфатированной α -L-фукозы, высвобождая фукоолигосахариды с разной степенью полимеризации. Также Mef2 катализировала гидролиз галактофуканов, выделенных из *Sargassum polycystum*, *S. cichorioides* и *S. latissima*, состоящих из α -1→3-связанных остатков сульфатированной L-фукозы [135, 136]. При этом активности по отношению к другим субстратам с α -1→3- связями, включая *F. vesiculosus* или *U. pinnatifida*, авторы не обнаружили. Полученный из *S. latissima* олигосахарид представлял собой октасахарид α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1→3- α -L-Fucp-1→3- α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1→3- α -L-Fucp-(2OSO₃⁻)-1→3- α -L-Fucp-(OSO₃⁻) с ответвлениями α -L-Fucp-(4OSO₃⁻)-1→, присоединенными к α -L-Fucp-(2OSO₃⁻) в C4 положении двух звеньев (второе звено с восстанавливающего конца и последнее звено с невосстанавливающего конца).

Остальные двенадцать охарактеризованных на сегодняшний день членов семейства GH107 представляют собой эндо-1→4- α -L-фукоиданазы. Первый член данного семейства FcnA (MfFcnA) был обнаружен в морской бактерии *M. fucanivorans*, клонирован в *E. coli* и охарактеризован [46]. Известно, что фукоиданаза FcnA специфически катализировала гидролиз α -1→4-гликозидных связей в молекулах фукоидана из бурой водоросли *P. canaliculata*, структура которого представляет собой повторяющиеся дисахаридные звенья [3- α -L-Fucp-

(2OSO₃⁻)-1→4- α -L-Фусп-(2,3OSO₃⁻)-1→]. Продуктами ферментативной реакции являлись тетра- и гексахаридами, построенные из 1→3-;1→4-связанных остатков α -L-фукозы с чередующимся 2-O-сульфатированием и 2,3-ди-O-сульфатированием. Фукоиданаза также была специфически активна в отношении α -1→4-гликозидных связей в молекулах фукоиданов из *F. vesiculosus* и *A. nodosum*, имеющих схожую с фукоиданом из *P. canaliculata* структуру. Позже была продемонстрирована активность FcnA по отношению к фукоидану из *C. filum*, который, как предполагалось, имеет в своем составе только α -1→3-гликозидные связи [47]. Это противоречило полученной ранее информации о субстратной специфичности FcnA к расщеплению α -1→4-гликозидных связей. Для внесения ясности были выделены продукты гидролиза фукоидана из *C. filum*, которые оказались идентичными продуктам, полученным ранее при гидролизе фукоидана из *P. canaliculata*. Таким образом, авторы исследования обнаружили наличие небольшого количества α -1→4-связей в фукоидане *C. filum*.

Бактериальные фукоиданазы P5AFcnA и P19DFcnA из *Psychromonas* sp. SW5A и *Psychromonas* sp. SW19D соответственно проявляли активность в отношении фукоиданов из *L. hyperborea* и *M. pyrifera*, структуры которых практически не исследованы [47]. Характерная «лестница» продуктов гидролиза, наблюдаемая на электрофореграмме после действия P5AFcnA на фукоидан из *L. hyperborea*, указывала на эндо-фукоиданазную активность. Фукоиданазы P5AFcnA и P19DFcnA также ограниченно катализировали расщепление фукоидана из *S. japonica*, в составе которого обнаружены только 1→3-связанные остатки сульфатированной α -L-фукозы, и фукоидана из *C. filum*, в структуре которого, помимо α -1→3-, были обнаружены α -1→4-гликозидные связи.

Анализ гомологии аминокислотных последовательностей позволил отнести к GH107 еще три фукоиданазы, Fp273, Fp277 и Fp279, обнаруженные в метагеноме морских бактерий [48]. Субстратную специфичность этих ферментов исследовали с использованием в качестве субстратов фукоиданов из шести видов водорослей порядка Fucales и из шести видов водорослей порядка Laminariales. Все три фермента катализировали расщепление фукоиданов, выделенных из бурых водорослей порядка Fucales, но не катализировали гидролиз фукоиданов, полученных из водорослей порядка Laminariales. Это указывало на специфичность ферментов к α -1→4-гликозидным связям, поскольку известно, что основная цепь фукоиданов, выделенных из водорослей порядка Laminariales, преимущественно состоит из остатков сульфатированной α -L-фукозы, связанных 1→3-гликозидными связями [137, 138]. Примечательно, что все исследуемые фукоиданазы были способны высвободить фукоолигосахариды из экстракта *Himantalia elongata*, содержащего α -1→3-фукан в качестве основного структурного мотива [139]. Это может быть связано с незначительным количеством α -1→4-связанных остатков L-фукозы, присутствующих в виде соэкстрагированных 1→3-;1→4- α -L-фуканов, в боковых

цепях или внутри основной цепи. Характер расщепления фукоиданов, детектированный с помощью ПААГ-электрофореза и гельпроникающей хроматографии, указывал на эндо-тип фукоиданазной активности.

Для определения специфичности фукоиданаз FFA1 [51] и FFA2 [52] из морской бактерии *F. algae* в качестве субстратов были использованы сульфатированные 1→3- и 1→3-;1→4- α -L-фуканы. Активность обеих фукоиданаз наблюдалась только в отношении 1→3-;1→4- α -L-фуканов. Формирование на ранних этапах гидролиза разнообразных по степени полимеризации продуктов свидетельствовало об эндо-типе действия ферментов. Полученные в результате действия FFA1 продукты гидролиза фукоидана из *S. horneri* были исследованы с помощью ЯМР-спектроскопии. Эти продукты в основном представляли собой олигосахариды со степенью полимеризации от 4 до 10, состоящие из чередующихся остатков фукозы с сульфатированием при C2 и при C2; C3. Кроме них были выделены разветвленный сульфатированный гексасахарид с ответвлением при C4 и тетрасахарид с дополнительной сульфатной группой при C4. Благодаря структурной характеристике продуктов гидролиза фукоидана из *S. horneri* было установлено, что его основная цепь состоит по большей части из повторяющегося фрагмента [\rightarrow 3- α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow 4- α -L-Fucp(2,3OSO₃⁻)-1 \rightarrow] со вставками [\rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-1 \rightarrow]. Несульфатированные боковые цепи состояли из двух остатков фукозы, α -L-Fucp-1 \rightarrow 2- α -L-Fucp-1 \rightarrow , которые присоединены к основной цепи в положении C4 моносахаридного остатка основной цепи.

Фукоиданаз FFA2 обладала более узкой специфичностью и катализировала деполимеризацию фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* в пределах структурного фрагмента [\rightarrow 3- α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow 4- α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow]_n, но не в фрагменте [\rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-1 \rightarrow 4- α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow]_n. К такому выводу пришли авторы на основании строения тетрасахарида, полученного ими в результате гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, и результатов тестирования активности FFA2 по отношению к синтетическим олигосахаридам различного строения.

Два гена, кодирующие фукоиданазы, были обнаружены в морской бактерии *F. haliotis*. Рекомбинантные фукоиданазы Fhf1 Δ 470 [49] и Fhf2 Δ 484 [50] были получены для исследования их свойств. Наибольшую активность оба фермента проявляли по отношению к 1→3-;1→4-связанному фукоидану из *F. evanescens*, с меньшей эффективностью они гидролизировали фукоидан из *F. vesiculosus*, который также является 1→3-;1→4- α -L-фуканом. Ни Fhf1 Δ 470, ни Fhf2 Δ 484 не были способны деполимеризовать фукоиданы из *U. pinnatifida* и *S. cichorioides*, в основной цепи которых остатки α -L-фукозы связаны только α -1→3-гликозидными связями, и галактофукан из *Turbinaria ornata*. Анализ спектров ЯМР продуктов, полученных в результате ферментативного гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, показал, что при действии

фукоиданазы Fhf1Δ470 образуются тетра-, окта- и декасахариды, состоящие из повторяющихся структурных фрагментов $[-\rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}1\rightarrow 4-\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}1\rightarrow]$. Ранее олигосахариды со степенью полимеризации 4, 6 и 8 и идентичной структурой были выделены из фракции низкомолекулярных продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, полученных при действии фукоиданазы FFA2 [52]. Анализ ЯМР показал, что фукоиданаза Fhf2Δ484 катализирует гидролиз $\alpha\text{-}1\rightarrow 4\text{-}$ связей между остатками L-фукозы, сульфатированными в C2 положении (аналогично Fhf1Δ470), но фукоиданаза Fhf2Δ484 дополнительно высвобождала олигосахариды, содержащие значительное количество 2,4-ди-О-сульфатированных остатков фукозы. Характер разделения на ПААГ-электрофореграммах обязующихся в результате гидролиза продуктов расщепления указывает на эндо-тип действия фукоиданаз Fhf1Δ470 и Fhf2Δ484, являющихся типичными представителями GH107.

Исследование фукоиданазы OUC-FaFcn1 из *F. algicola* показало, что она является $\alpha\text{-}1\rightarrow 4\text{-L}$ -фуканазой семейства GH107 [53]. Фермент катализирует деполимеризацию фукоидана из бурой водоросли порядка Fucales с образованием различных по степени полимеризации олигосахаридов. Вид водорослей в исследовании не уточняется, однако известно, что бурые водоросли данного порядка продуцируют фукоиданы, углеводная цепь которых состоит из $1\rightarrow 3\text{-}; 1\rightarrow 4\text{-}$ связанных остатков $\alpha\text{-L}$ -фукозы. Фукоиданы, имеющие в составе только $\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-}$ гликозидные связи, почти не расщеплялись фукоиданазой OUC-FaFcn1. Основным продуктом деполимеризации фукоидана представлял собой дисахарид с тремя сульфатными группами, локализация которых не была установлена. Как правило, минимальными по степени полимеризации продуктами, полученными в результате действия других фукоиданаз семейства GH107, являлись тетрасахариды.

В морской бактерии *S. raucimobilis* PF-1 была обнаружена фукоиданаза, локализованная на поверхности клеток бактерии. Обработка галактофукана из *U. pinnatifida* клеточным экстрактом бактерии приводила к его деградации с образованием олигосахаридов. Действие бактериального экстракта на фукоидан не приводило к образованию свободной L-фукозы. Хромогенный субстрат, 4-нитрофенил- $\alpha\text{-L}$ -фукопиранозидфукоза, также не подвергался гидролизу при действии экстракта. Исходя из этих данных, авторы предположили, что бактерия продуцирует фукоиданазу эндо-типа действия [44].

Штамм бактерии *Flavobacterium* sp. F-31 продуцировал внутриклеточные ферменты, участвующие в деградации фукоидана. Клеточный экстракт этой бактерии с высокой скоростью катализировал деполимеризацию фукоидана из *Cladosiphon okamuranus* [140].

Фукоиданаза, выделенная из морской бактерии "*F. marina*" SA-0082, катализировала расщепление $\beta\text{-}1\rightarrow 4\text{-}$ гликозидных связей между остатками маннозы и глюкуроновой кислоты. Субстратом для изучения активности фермента являлся фукоидан SFGM

(фукоглюкурономаннан сульфат) из *S. sculpera*, в результате гидролиза которого были получены сульфатированные 4,5-ненасыщенные фукоглюкурономаннан олигосахариды. Практически все продукты имели на невосстанавливаемом конце 4-дезоксигалакто-4-енопиранозилурановую кислоту, а на восстанавливаемом конце – маннозу или ее сульфатированные производные. Структура продуктов свидетельствовала о том, что фермент является лиазой, расщепляющей субстрат по механизму β -элиминирования [131].

Для фукоиданазы FunA из морской бактерии *W. fucanilytica* не нашлось гомологов по аминокислотной последовательности среди членов GH107. Фукоиданаза FunA стала первым членом нового 168 семейства гликозидгидролаз (GH168) [57]. Фукоиданы из *F. vesiculosus*, *A. nodosum* и *M. pyrifera*, которые эффективно расщеплялись ферментами семейства GH107, не подвергались гидролизу фукоиданазой FunA. Для изучения субстратной специфичности FunA авторы исследования провели экстракцию и выделение сульфатированного α -1 \rightarrow 3-L-фукана из морского огурца *I. badionotus*. С помощью ЯМР-спектроскопии был проведен анализ структуры продуктов ферментативного расщепления сульфатированного фукана. Установлено, что основным продуктом деполимеризации является олигосахарид следующей структуры: α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2OSO₃⁻). Таким образом, было показано, что FunA действует по эндо-типу и катализирует расщепление α -1 \rightarrow 3-гликозидных связей между 2-О-сульфатированными и нессульфатированными остатками фукозы в молекуле фукансульфата из *I. badionotus*.

Фукоиданаза Fun174A из *W. aestuarii* OF219 также является первым представителем недавно открытого семейства GH174. Данная фукоиданаза катализировала расщепление фукоидана из *I. badionotus* по эндо-типу [24]. Основным компонентом продуктов исчерпывающего ферментативного гидролиза фукансульфата из *I. badionotus* является тетрасахарид Fuc4S4 со следующей структурой: α -L-Fucp-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2OSO₃⁻)-1 \rightarrow 3- α -L-Fucp(2OSO₃⁻). На основании структуры продуктов ферментативного гидролиза, авторы сделали вывод, что атаке фермента в субстрате подвергались α -1 \rightarrow 3-гликозидные связи между 2-О-сульфатированным и нессульфатированным остатками L-фукозы. Фукоиданаза не катализировала гидролиз α -1 \rightarrow 3-связей между остатками фукозы с иной схемой сульфатирования ни в молекулах фукансульфата, выделенного из голотурии *I. badionotus*, ни в молекулах α -1 \rightarrow 3-фуканов, выделенных из других источников. Сульфатированные 1 \rightarrow 3-;1 \rightarrow 4- α -L-фуканы бурых водорослей фукоиданаза Fun174A также не расщепляла. Таким образом, специфичность Fun174A практически идентична специфичности вышеописанной FunA. Отличием является вероятный эндо-процессивный тип действия Fun174A, при котором Fuc4S4 является преимущественным продуктом на протяжении всего хода реакции, тогда как в результате действия FunA образуются продукты с различной

степенью полимеризации. Различные схемы гидролиза указывают на то, что они могут совместно воздействовать на фукоиданы с образованием смешанных продуктов с различными степенями полимеризации.

Несколько гомологов Fun174A было обнаружено в геномах морских бактерий *R. marina*, *S. bacterium* и *W. fucanilytica*. Так же, как и Fun174A, они были классифицированы в семейство GH174 в соответствии со сходством их аминокислотных последовательностей. Они были экспрессированы в *E. coli*, но полученные рекомбинантные фукоиданазы не проявляли активность по отношению к фукоидану из *I. badionotus* [24]. Вероятно, данные ферменты имеют отличную от Fun174A субстратную специфичность. Не исключено, что они могут катализировать гидролиз других типов O-гликозидных связей.

Необходимо отметить, что в настоящее время исследования фукоиданаз не носят систематический характер, в связи с чем довольно трудно установить зависимость специфичности фермента от его структуры. Наименее исследованными на сегодняшний день являются недавно открытые семейства гликозидгидролаз GH168 и GH174. Тем не менее, как уже можно заметить, фукоиданазы все чаще используются исследователями в качестве молекулярных инструментов для установления структурных фрагментов фукоиданов, информации о строении которых не удавалось получить другими методами.

1.1.7 Пространственная структура фукоиданаз 107 структурного семейства гликозидгидролаз

Многие O-гликозидгидролазы бактериального происхождения имеют мультидоменную (син. мультимодульную) организацию полипептидных цепей. Эти домены могут выполнять каталитическую, субстрат-связывающую и другие функции [141]. С. Колин (S. Colin) и др. посредством биоинформатического анализа аминокислотной последовательности фукоиданазы FcnA впервые продемонстрировали, что ферменты семейства GH107 не являются исключением и могут содержать помимо каталитического по 3-4 дополнительных домена [46]. Функция этих доменов до сих пор остается малопонятной.

В настоящее время большой интерес вызывает трехмерная структура фукоиданаз. Существует лишь несколько работ, посвященных изучению их трехмерной структуры, поскольку получение кристалла для структурных исследований – сложная, трудоемкая и финансово затратная задача.

В настоящее время трехмерные структуры были определены только для двух эндофукоиданаз 107 семейства (GH107), MfFcnA (она же FcnA) из *M. fucanivorans* SW5 и P5AFcnA из *Psychromonas* sp. SW5A [47]. Биоинформатический анализ показал, что фукоиданазы MfFcnA состоит из семи различных доменов: сигнальной последовательности, каталитического домена

(D1), трех иммуноглобулин (Ig)-подобных доменов (R1, R2 и R3), домена, состоящего из β -листов и С-концевого домена секреции. Авторам не удалось получить кристалл полноразмерной фукоиданазы MfFcnA. Подобрать условия кристаллизации удалось только для усеченных с N- и С-конца белковых конструкций MfFcnA4 и MfFcnA9. Анализ полученной пространственной модели MfFcnA4 показал, что N-концевой каталитический домен D1 имеет топологию (α/β) 8-баррель и связан с тремя смежными (Ig)-подобными доменами (Рисунок 3, А).

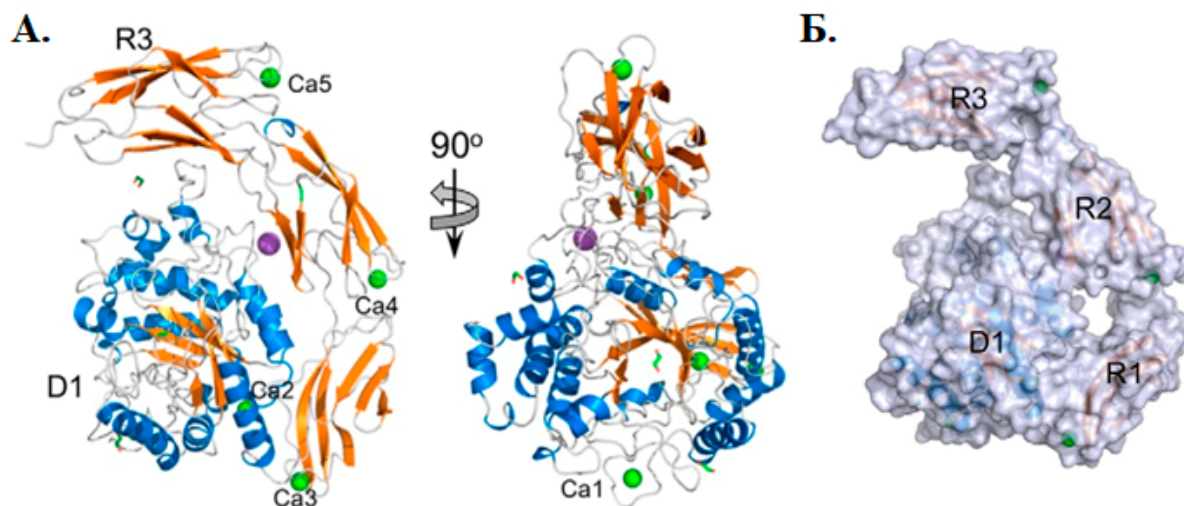


Рисунок 3 – (А) Трехмерная структура усеченной фукоиданазы MfFcnA4, элементы вторичной структуры окрашены синим (α -спирали) и оранжевым (β -листы) цветами. Структура MfFcnA4 ориентирована так, чтобы показать три последовательных С-концевых Ig-подобных домена (R1, R2 и R3), которые «оборачиваются» вокруг N-концевого каталитического домена (D1), имеющего топологию (β/α) 8-барреля, который координирует этиленгликоль (зеленые палочки). Атомы кальция изображены в виде зеленых сфер, атом натрия — в виде фиолетовых сфер, а связанные этиленгликоль и малонат-ион — в виде зеленых палочек. (Б) Структура поверхности MfFcnA4. Иллюстрация заимствована из [47] и частично адаптирована

В каталитическом домене D1 фукоиданазы MfFcnA4 были определены два участка, связывающие атомы Ca. Один из атомов Ca связан с петлей, ведущей в α -спираль 5, и октаэдрически координирован атомом кислорода молекулы воды, атомами кислорода боковых цепей Asp330, Asn335 и Asp336, а также атомами кислорода карбонила Phe327 и Arg332 основной полипептидной цепи. Второй и, вероятно, более слабо связанный атом Ca обнаружен вблизи С-конца α -спирали 7. Данный атом Ca также октаэдрически координирован, но четырьмя молекулами воды и двумя атомами кислорода двух аминокислот: одной из карбоксилата Asp79, а другой из карбонила Thr77 основной цепи белка. Авторы полагают, что три (Ig)-подобных домена R1-3 выполняют Ca^{2+} -связывающую функцию, что способствует структурной жесткости для придания вытянутой конформации фермента в растворе. Такое предположение было сделано на основании структурного сходства с кадгериноподобными

модулями CDHL, обнаруженными в гликопротеине из *Staphylococcus aureus*. Множественные CDHL домены гликопротеина из *S. aureus* напоминают кальций-зависимые эукариотические кадгеринины и функционируют как жесткий стержень, обеспечивающий экспонирование домена N-концевого лектина наружу от поверхности клетки бактерии [142]. Попытки получить кристалл усеченной фукоиданазы MfFcпA4 в комплексе с субстратом (сульфатированными фукоолигосахаридами) не увенчались успехом. Однако созданная для достижения этой цели укороченная на один (Ig)-подобный домен R3 конструкция MfFcпA9 помогла получить представление о конформационных предпочтениях составных доменов в этих полипептидах. Конструкции MfFcпA4 и его укороченная форма MfFcпA9 имели совершенно разное кристаллографическое окружение. Это позволило предположить, что первые три домена D1, R1 и R2 в MfFcпA составляют структурно стабильную единицу, а удаленный C-концевой Ig-подобный домен R3 может проявлять конформационную гибкость. Примечательно, что последующее удаление еще одного (Ig)-подобного домена R2 привело к экспрессии белка в нерастворимой форме.

Белок P5AFcпA имеет однодоменную организацию и включает только N-концевой каталитический домен. Сравнительный структурный анализ каталитических доменов MfFcпA и P5AFcпA показал, что наиболее структурно близкими белками являются представители α -L-фукозидаз 29 семейства гликозидгидролаз (GH29). Представители семейства GH29 обладают 1→2-, 1→3-, 1→4- и/или 1→6- α -L-фукозидазной активностью и в основном действуют на невосстанавливающие концы фукозилированных гликанов или гликоконъюгатов [143]. Некоторые из них, как показано, могут участвовать в деградации фукоиданов бурых водорослей, отщепляя 1→2-, 1→3- и/или 1→4-связанные остатки α -L-фукозы от сульфатированных фукоолигосахаридов и/или фукоиданов [144].

Структурное выравнивание MfFcпA4 и P5AFcпA с α -L-фукозидазой ViAfcB семейства GH29 из *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* в комплексе с его лигандом, лакто-N-фукопентаозой II, выявило структурное сходство между их каталитическими доменами (α/β)₈ (Рисунок 4, А). Сравнение расположения аминокислотных остатков активного центра α -L-фукозидазы ViAfcB и фукоиданаз показало структурную консервативность каталитических нуклеофилов, которыми являются Asp172 в ViAfcB, Asp226 и Asp201 в предполагаемых активных центрах MfFcпA4 и P5AFcпA соответственно (Рисунок 4, Б). Роль кислоты-основания в ViAfcB выполняет Glu217, который заменен на His294 в MfFcпA4 и His276 в P5AFcпA. Каталитическая функция этих остатков была подтверждена путем замены остатка His294 в MfFcпA на Gln, что приводило к полной потере активности фукоиданазы [144].

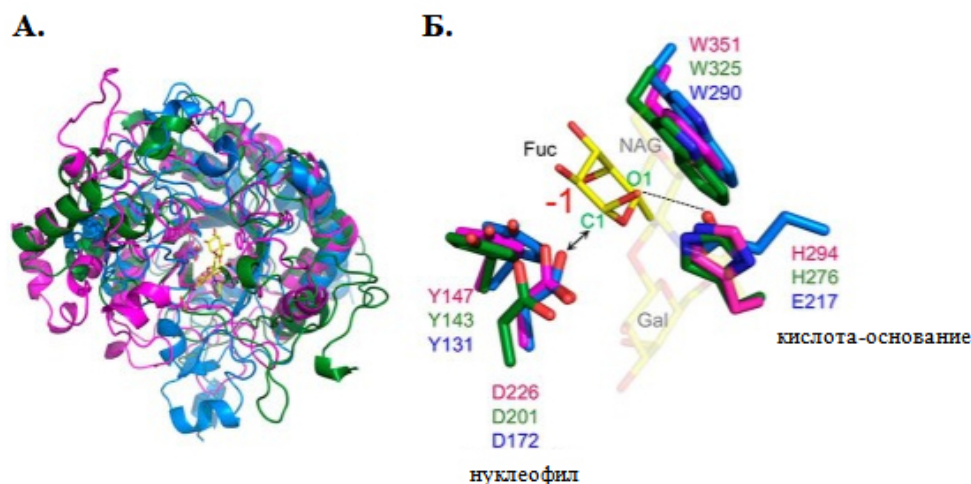


Рисунок 4 – Сравнительный анализ структур MfFcpA4 и P5AFcpA с α -L-фукозидазой ViAfcB (GH29). (А) Структура MfFcpA4 (выделена розовым) и P5AFcpA (выделена зеленым), наложенные на структуру ViAfcB (выделена синим; шифр PDB: 3UET) в комплексе с лакто-N-фукопентаозой II, чтобы продемонстрировать структурное сходство между топологиями каталитических доменов. (Б) Сравнение каталитических сайтов между MfFcpA4 (аминокислоты выделены розовым), P5AFcpA (аминокислоты выделены зеленым) и ViAfcB (аминокислоты выделены синим). Субстрат, связанный с ViAfcB, выделен желтым цветом. Иллюстрация заимствована из [47] и частично адаптирована

Моделирование MfFcpA с L-фукопиранозо-2-сульфатом в качестве лиганда с использованием в качестве шаблона комплекса ViAfcB с его лигандом показало, что основной карман расположен в -1 подсайте активного центра. Отсутствие консервативности в областях, граничащих с -1 подсайтом в ферментах GH107, вероятно, отражает различную архитектуру подсайтов, которая позволяет ферментам распознавать различные структуры фукоидана.

Было показано, что MfFcpA, также как и α -L-фукозидазы семейства GH29, действует по сохраняющему гидролитическому механизму. При этом боковая цепь Asp226 действует как нуклеофил, а боковая цепь His294 действует как кислота-основание (проявляет кислотно-основные свойства). Таким образом, ферменты GH107 отличаются от ферментов GH29 тем, что используют гистидиновую боковую цепь в качестве кислотно-основного катализатора в своем сохраняющем механизме.

1.2 Противоопухолевая и канцеропреventивная активности продуктов деполимеризации фукоиданов

Онкологические заболевания стоят на втором месте по уровню смертности после заболеваний сердечно-сосудистой системы в промышленно развитых странах, несмотря на десятилетия фундаментальных и клинических исследований перспективных новых лекарств [8]. Химиотерапия, лучевая терапия, хирургия и комбинации этих методов используются для лечения рака. К сожалению, используемые в настоящее время препараты демонстрируют

нежелательные побочные эффекты и низкую выживаемость пациентов. Поэтому в настоящее время остро стоит вопрос о разработке альтернативных препаратов, не обладающих токсичностью по отношению к нормальным клеткам и тканям или, как минимум, с менее выраженными побочными эффектами.

Фукоиданы бурых водорослей давно рассматриваются в качестве перспективных кандидатов на эту роль, однако структурная сложность, высокая молекулярная масса и вязкая природа фукоиданов могут ограничивать их применение. Недавние исследования *in vivo* продемонстрировали, что фукоиданы из *S. okamuranus* и *F. vesiculosus* способны абсорбироваться кишечным трактом лабораторных животных при пероральном введении посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза. В то же время скорость поглощения фукоидана кишечным трактом оказалась невелика, но достаточна для его детектирования в различных органах и тканях [145, 146]. Известно, что кишечная проницаемость полианионных полисахаридов, гепарина и гиалуронана, обратно пропорциональна размеру их молекул и также зависит от их дозы [147, 148]. Таким образом, вышеуказанные ограничения применения фукоиданов можно преодолеть путем деполимеризации их молекул до сульфатированных фукоолигосахаридов, которые будут обладать значительно меньшей молекулярной массой, хорошей растворимостью, улучшенной кишечной проницаемостью и установленной структурой, определение которой вызывает гораздо меньше сложностей. Предполагается, что низкая молекулярная масса производных фукоидана может способствовать усиленному всасыванию в кишечнике, увеличению концентрации в кровеносных сосудах и эффективному действию против рака различных органов.

В настоящее время продукты деполимеризации фукоиданов получают химическими, физическими и ферментативными способами, либо с использованием их различных комбинаций [149]. Каждый из методов имеет как положительные, так и отрицательные стороны. Например, кислотный гидролиз фукоиданов, несмотря на относительную простоту и невысокую стоимость, как правило, протекает в достаточно жестких условиях. Это приводит не только к расщеплению O-гликозидных связей, но и нежелательному отщеплению сульфатных групп [150], количество и расположение которых важно для биологических эффектов, проявляемых фукоиданами. Глубину химического гидролиза и возникновение побочных реакций сложно контролировать. Физические способы деполимеризации фукоиданов подразумевают использование высоких доз ионизирующего облучения, что требует применения сложного и дорогостоящего оборудования, а также высоких энергий. Механизм расщепления с использованием ионизирующего излучения пока остается слабоизученным, что затрудняет прогнозирование протекания побочных реакции [151]. К плюсам метода можно отнести сохранение количества сульфатных групп при расщеплении гликозидных связей в молекулах

фукоиданов [151]. Применение ферментов с изученной специфичностью и механизмом действия позволяет более точно контролировать процесс деполимеризации фукоиданов и исключает протекание нежелательных побочных реакций. Использование ферментов с различной специфичностью может позволить направленно и точно редактировать структуры фукоиданов. К минусам можно отнести слабую изученность таких ферментов и стоимость ферментных препаратов на начальном этапе разработки. В то же время накопленный в настоящее время опыт применения ферментов и ферментных препаратов в различных областях промышленности указывает на множество способов преодоления проблемы высоких затрат при их использовании, таких как иммобилизация ферментов на различных носителях, создание микроорганизмов-продуцентов внеклеточных ферментов т.п. [152, 153].

Несмотря на большое количество исследований противоопухолевого потенциала различных производных фукоиданов (с частично или полностью удаленными сульфатными группами, или, напротив, дополнительно сульфатированными), число исследований противоопухолевой активности производных, полученных путем деполимеризации фукоидана, невелико.

Так, была исследована противоопухолевая активность фукоолигосахаридов, полученных путем автогидролиза фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*. Анализ MALDI-TOF MS показал, что продуктами автогидролиза являлись моносульфатированная фукоза и сульфатированные (до 5 сульфатных групп) фукоолигосахариды со степенью полимеризации 2, 4 и 6, в том числе галактозосодержащие сульфатированные олигосахариды. Было показано, что негидролизированный фукоидан проявляет противоопухолевую активность в отношении двух линий клеток меланомы человека SK-MEL-28 и SK-MEL-5. Низкомолекулярные фрагменты практически не влияли ни на пролиферацию клеток SK-MEL-5, ни на образование ими колоний в мягком агаре. Однако они эффективно ингибировали формирование колоний клеток SK-MEL-28, также как и нативный фукоидан (на 70%). Вероятно, ингибирующая активность производных в отношении SK-MEL-28 зависела от наличия сульфатных групп и 1→4-связанных остатков α -L-фукопиранозы в основной цепи фукоидана и олигосахаридов, но не от молекулярной массы. Напротив, для проявления фукоиданом и его производными противоопухолевой активности в отношении клеток SK-MEL-5 молекулярная масса имела большее значение [154].

Продукты гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, полученные другим способом – с помощью рекомбинантной фукоиданазы FFA1, имели регулярную структуру и состояли из повторяющегося фрагмента $[-\rightarrow 3-\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)-1\rightarrow 4-\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)-1\rightarrow]_n$. Их молекулярная масса составляла около 50 кДа. Исследование противоопухолевой активности нативного фукоидана и его производного проводились *in vitro*. Было обнаружено, что оба

тестируемых полисахарида незначительно ингибируют пролиферацию трех линий клеток рака толстого кишечника HT-29, HCT-116 и DLD-1 (на 2–4%) даже через 72 ч обработки. Однако они значительно ингибировали самопроизвольное формирование и рост колоний клеток в концентрации 100 мкг/мл. Нативный фукоидан ингибировал формирование колоний клеток HT-29 на 31%, HCT-116 на 41% и DLD-1 на 85%. Производное, полученное путем ферментативной трансформации нативного фукоидана, уменьшало количество колоний на 26%, 31% и 68% соответственно. Это исследование демонстрирует практическое применение ферментов для модификации нативных фукоиданов с целью получения регулярных и легче характеризующихся производных [87].

Низкомолекулярные продукты (800 Да) ферментативного гидролиза фукоидана из *Sargassum hemiphyllum* были оценены в качестве дополнительной терапии к таргетным химиопрепаратам у пациентов с метастатическим колоректальным раком. Результаты исследования продемонстрировали улучшение показателей контроля заболевания при их использовании [101]. Продукты ферментативной деградации фукоидана из этого же вида водоросли проявляли антиангиогенную активность *in vitro* в условиях гипоксии по отношению к клеткам рака мочевого пузыря T24. Предполагается, что это может быть связано с подавлением сигнального пути, регулируемого HIF-1/VEGF [155]. В другом исследовании продукты ферментативного расщепления фукоидана из бурых водорослей *S. hemiphyllum* (500–800 Да), состоящие в основном из сульфатированной L-фукозы (степень сульфатирования 38,9%) были тестированы на наличие противоопухолевой активности по отношению к клеткам рака толстого кишечника HCT 116 [156]. Низкомолекулярные продукты увеличивали гибель раковых клеток и ослабляли побочные эффекты при их использовании совместно с этопозидом, снижающим выработку провоспалительного цитокина IL-6 и хемокина CCL2/MCP-1. Производные также снижали количество макрофагов M2, способствующих развитию опухоли. К сожалению, авторы исследования не проводили оценку эффективности низкомолекулярного производного фукоидана по сравнению с нативным. Эта же фракция низкомолекулярного фукоидана продемонстрировала способность к усилению противораковых эффектов химиотерапии на основе фторпиримидина [157].

Низкомолекулярные сульфатированные фрагменты галактофукана (7,2 кДа) из *Sargassum thunbergii*, полученные путем автогидролиза, ингибировали пролиферацию клеток рака легких человека A549 более эффективно, чем нативный галактофукан (143,0 и 36,7 кДа) и его высокомолекулярное производное (158,8 и 32,1 кДа). Низкомолекулярная фракция состояла из остатков 1→3-связанной α -L-фукопиранозы, сульфатированных в положении C4 с минорными включениями остатков галактозы (1→2-и/или 1→6-связанных), тогда как в нативном фукоидане и его высокомолекулярном производном молярное соотношение

галактозы к фукозе было значительно выше [18]. Напротив, среди полученных после фракционирования фукоидана из *Sargassum filipendula* образцов с низкой (10–50 кДа), средней (50–100 кДа) и высокой (>100 кДа) молекулярной массой, последний оказывал наибольшее антипролиферативное действие в отношении клеток остеосаркомы MG63. Данная фракция сильнее других ингибировала метаболическую активность этой линии клеток [19]. В то же время высокомолекулярная фракция фукоидана приводила к деполяризации митохондриальной мембраны и фрагментированию ядер клеток в большей степени, чем при обработке клеток низкомолекулярной фракцией фукоидана. Стоит отметить, что низкомолекулярная фракция фукоидана имела и самый низкий процент сульфатирования. Вероятно, противораковый эффект фукоиданов определяется совокупностью сразу нескольких факторов, а не только уровнем сульфатирования или молекулярной массой в отдельности. Такое предположение можно сделать и на основании исследования противоопухолевой активности фракций, полученных путем химического гидролиза фукоидана из бурой водоросли *U. pinnatifida* и дополнительно сверхсульфатированных [158]. После дополнительного сульфатирования содержание сульфатных групп в продуктах гидролиза с низкой (5,6 кДа) молекулярной массой увеличилось с 35,5 до 56,8%, в продуктах с высокой (262 кДа) молекулярной массой – с 31,7 до 41,2%. Сульфатные группы в производных располагались преимущественно в C2 и C4 положениях при остатках 1→3-связанной α -L-фукозы. Было показано, что низкомолекулярная фракция дозозависимо ингибировала пролиферацию клеток рака желудка AGS от 37,3 до 68,0%, а высокомолекулярная фракция – от 20,6 до 35,8%, в зависимости от концентрации вещества.

Другие исследователи, с помощью диализа получили две фракции фукоидана из *U. pinnatifida*, различающиеся молекулярными массами: около 440 кДа (высокомолекулярная фракция) и 2–10 кДа (низкомолекулярная фракция). Фракция с низкой молекулярной массой продемонстрировала более эффективное дозозависимое ингибирование пролиферации клеток рака молочной железы двух линий, MCF-7 и MDA-MB-231, чем высокомолекулярная фракция. Было показано, что она индуцировала апоптоз клеток данных линий [159]. Аналогичным образом на клетки MDA-MB-231 действовала другая низкомолекулярная фракция (500 Да), полученная в результате действия гликозидаз на фукоидан из *Cladosiphon navae-caledoniae*. Апоптоз был вызван способностью фукоидана индуцировать митохондриальную дисфункцию клеток рака, опосредованную увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и последующей активацией каспаз [160].

Фракция, содержащая низкомолекулярный манногалактофукан, была получена ферментативным расщеплением галактофукана из *U. pinnatifida*. Она состояла в основном из остатков 1→3-связанной α -L-фукозы и 1→3 и/или 1→6-связанной β -D-галактозы. Остатки α -L-фукозы были сульфатированы в положениях C2 и/или C4, остатки галактозы – в положении

С3. Фракция также содержала минорное количество остатков терминальной маннозы, присоединенной посредством 1→4-гликозидных связей. Показано, что вышеуказанная фракция в большей степени, чем нативный галактофукан, индуцировала остановку клеточного цикла в фазе G0/G1 клеток рака предстательной железы человека PC-3, а также вызывала их гибель посредством подавления пути Akt/GSK-3β/β-катенин. Низкомолекулярные производные также в большей степени повышали экспрессию мРНК рецептора смерти-5 (DR-5), соотношение Bax к Bcl-2, расщепление каспаз и PARP, деполяризацию мембранного потенциала клеток, а также образование активных форм кислорода (АФК). При изучении *in vivo* под действием низкомолекулярной фракции (200–400 мг/кг) наблюдалось эффективное уменьшение как объема, так и размера опухоли на модели ксенографтов мышей, которым была введена культура клеток рака предстательной железы человека PC-3 [20].

Дж. Чой (J. Choi) и соавторы для деполимеризации фукоидана из *F. vesiculosus* применили высокие дозы гамма-излучения [21]. При облучении фукоидана дозами 30, 50 и 100 кГр были производные с молекулярными массами 16, 10 и 7 кДа соответственно. Стоит отметить, что данный способ деполимеризации не приводил к существенной потере сульфатных групп производными, как при химических методах деполимеризации. Низкомолекулярный фукоидан (7 кДа) обладал более высокой цитотоксичностью, чем нативный по отношению к клеткам рака желудка AGS, молочной железы MCF-7 и печени HepG2 человека [21].

Фукоидан из *C. okamuranus* состоит из остатков L-фукозы, D-ксилозы, D-глюкуроновой кислоты в соотношении 4,0:0,03:1,0 со степенью сульфатирования 0,33–0,34 и степенью ацетилирования 0,2. Противоопухолевую активность фукоидана из *C. okamuranus* и его производных с низкой (6,5–40 кДа), средней (110–138 кДа) и высокой (300–330 кДа) молекулярными массами, полученных в результате гидролиза при высоких температурах без потери функциональных групп исследовали *in vivo*. В качестве моделей были использованы мыши с карциномой толстой кишки Colon-26. Введение образцов фукоиданов проводилось перорально. В группе мышей, получавших низкомолекулярный фукоидан, фиксировали значительное подавление роста опухоли и увеличение времени выживания. Среднее время выживания в контрольной группе и группах, получавших низко-, средне- и высокомолекулярный фукоидан, составляло 23, 46, 40 и 43 дня соответственно [161].

Исследователи из Японии изучили противоопухолевый потенциал синтезированных сульфатированных фукоолигосахаридов с различными СП и схемами сульфатирования [162]. Так, было синтезировано 4 производных, построенных из 1→3-связанных остатков α-L-фукозы (2,4-ди-О-сульфатированное, 4-О-сульфатированное, 2-О-сульфатированное и нессульфатированное), а также 5 производных, построенных из 1→3-;1→4-связанных остатков

α -L-фукозы (2,3,4-три-О-сульфатированное, 2,3-ди-О-сульфатированное, 3,4-ди-О-сульфатированное). Все производные продемонстрировали высокий уровень антипролиферативной активности по отношению к клеткам рака молочной железы человека MCF-7 и шейки матки человека HeLa, однако наибольший эффект оказывали 2,4-ди-О-сульфатированное 1→3-связанное производное и 3,4-ди-О-сульфатированное 1→3-;1→4-связанное производное, а наименьший – нессульфатированное и сульфатированное только в положении С4 производные. Полученные соединения снижали способность к пролиферации нормальных фибробластов легких человека WI-38 дозозависимым образом, за исключением 3,4-ди-О-сульфатированного производного с α -1→3; α -1→4-связями в основной цепи. Оно не обладало ни цитотоксичностью, ни антипролиферативной активностью в отношении клеток WI-38, вероятно, производное такой структуры проявляет селективную антипролиферативную активность только в отношении раковых клеток человека. Было выяснено, что для проявления антипролиферативной активности минимальная степень полимеризации такого производного должна быть равна 4, при этом активность производного с СП = 4 была выше, чем у производного с СП = 6. Примечательно, что фукоидан из *F. vesiculosus* (600 кДа) проявлял схожую 3,4-ди-О-сульфатированному α -1→3; α -1→4-связанному тетрасахариду антипролиферативную активность, они оба индуцировали апоптоз в клетках MCF-7 и HeLa посредством активации каспазы-8 и -9 соответственно. Однако все вышеупомянутые олигосахариды имели на восстанавливающем конце протяженный гидрофобный алкильный агликон C₈H₁₇ и, вследствие этого, имели тенденцию к мицеллообразованию. Поэтому сравнение противоракового действия данных олигосахаридов в сравнении с нативным фукоиданом, на наш взгляд, не совсем корректно.

Производные фукоидана из *S. horneri*, полученные в результате действия фукоиданазы FFA1 из морской бактерии *F. algae* КММ 3553^T, представляли собой гомогенные олигосахариды со СП от 4 до 10 и резистентную к действию фермента высокомолекулярную фракцию. Было показано, что полисахариды, нативный фукоидан и резистентная фракция, ингибировали образование и рост колоний клеток колоректальной карциномы DLD-1 примерно на 50%. Однако при обработке клеток DLD-1 олигосахаридами не отмечено влияние на формирование колоний данным типом раковых клеток. Некоторые различия в противоопухолевой активности фукоиданов и олигосахаридов можно объяснить особенностями их строения. Авторы предположили, что СП фрагментов фукоидана сильно влияет на противоопухолевую активность [51].

Все эти исследования демонстрируют, что не только фукоиданы, но и некоторые их низкомолекулярные производные способны ингибировать развитие различных типов злокачественных опухолей и могут являться эффективными противоопухолевыми агентами. В

некоторых случаях молекулярная масса является критическим фактором в определении противоракового потенциала фукоидана по отношению к определенным опухолевым клеточным линиям. Очевидно, что производные фукоидана могут обладать как повышенной, так и пониженной активностью по сравнению с нативным полисахаридом по отношению к различным видам рака.

Фукоиданы обладают потенциалом использования в качестве химиопрофилактического средства против канцерогенеза. Показано, что некоторые фукоиданы способны препятствовать неопластической трансформации нормальных клеток в опухолевые за счет ингибирования транскрипционного фактора – активирующего белка-1 (AP-1), который участвует в регуляции клеточной пролиферации [163, 164]. Регуляция клеточной пролиферации транскрипционными факторами, входящими в состав AP-1, имеет решающее значение для многостадийного развития рака [165]. Бесконтрольная стимуляция AP-1 может привести к неопластической трансформации нормальных клеток. Транскрипционная активность AP-1 может быть стимулирована рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) посредством связывания с его лигандом, эпидермальным фактором роста (EGF) [165, 166]. EGFR играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток. Многие виды карцином возникают по причине мутаций в данном рецепторе. Таким образом, EGFR является одной из многообещающих молекулярных мишеней в онкологии.

В настоящее время в литературных источниках нет упоминаний об исследовании потенциала низкомолекулярных производных фукоиданов в качестве ингибиторов трансформации клеток, индуцированной EGF. Однако было замечено, что низкомолекулярное производное фукоидана (7 кДа) из *F. vesiculosus*, полученное в результате его деполимеризации гамма-облучением, проявляло более высокую, чем нативный фукоидан, ингибирующую активность в отношении неопластической трансформации эпидермальных клеток мыши JB6 Cl41, индуцированной 12-О-тетра-деканойлфорбол-13-ацетатом (TPA). Предполагается, что повышенная ингибирующая активность может быть связана с более легким доступом низкомолекулярных фрагментов фукоидана к молекулам-мишеням [21]. Известно, что TPA, как и EGF, является промотором канцерогенеза, который действуя через митоген-активируемые протеин киназы (МАРК), активирует транскрипционные факторы AP-1, а затем NF-κB и нижестоящие процессы транскрипции [167]. К сожалению, на сегодняшний день это единственное упоминание исследований канцеропреventивной активности низкомолекулярных производных фукоиданов, и данное направление только начинает развиваться. Совокупность имеющейся информации свидетельствуют о том, что фукоиданы и продукты их деполимеризации могут обладать значительным химиопрофилактическим потенциалом против канцерогенеза. Однако реальный потенциал этого направления еще предстоит определить.

2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Идентификация и биоинформационный анализ фукоиданаз морской бактерии

W. fucanilytica CZ1127^T

Ранее было показано, что морская бактерия *W. fucanilytica* CZ1127^T, изолированная из морской воды прибрежной зоны [168], способна расщеплять сульфатированные фукозосодержащие полисахариды, выделенные из различных источников, включая голотурии и бурые водоросли [169]. Штамм морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T был выбран в качестве продуцента объектов исследования, поскольку его геном отличался наличием сразу четырех последовательностей, кодирующих гипотетические фукоиданазы семейства GH107. Количество гипотетических генов фукоиданаз в геномах других прокариотических бактерий, как правило, ограничивается двумя или тремя [46, 48, 49, 51, 52].

2.1.1 Идентификация и доменная организация фукоиданаз FWf1–4

Геном морской грамотрицательной бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T был проанализирован на наличие аминокислотных последовательностей, гомологичных уже известным фукоиданазам, принадлежащим 107 семейству гликозидгидролаз (GH107 по классификации CAZy). В результате анализа был выявлен кластер генов, предположительно кодирующих ферменты, участвующие в деградации фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов. Кластер содержит гипотетические гены четырех фукоиданаз семейства GH107, одной фукоиданазы семейства GH168, пяти фукозидаз семейства GH29 и одной – семейства GH95, шести сульфатаз семейства S1 (по классификации SulfAtlas), а также несколько генов, кодирующих белки с неизвестной функцией (Рисунок 5). Аминокислотные последовательности четырех предполагаемых фукоиданаз AXE80_07305, AXE80_07310, AXE80_07420 и AXE80_07425 ранее уже были отнесены к семейству GH107 базы данных CAZy посредством аннотации генома, но их функции еще не были подтверждены. Для предполагаемых фукоиданаз AXE80_07305, AXE80_07310, AXE80_07420 и AXE80_07425 нами были даны обозначения FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 (далее сокращенно FWf1–4) соответственно.

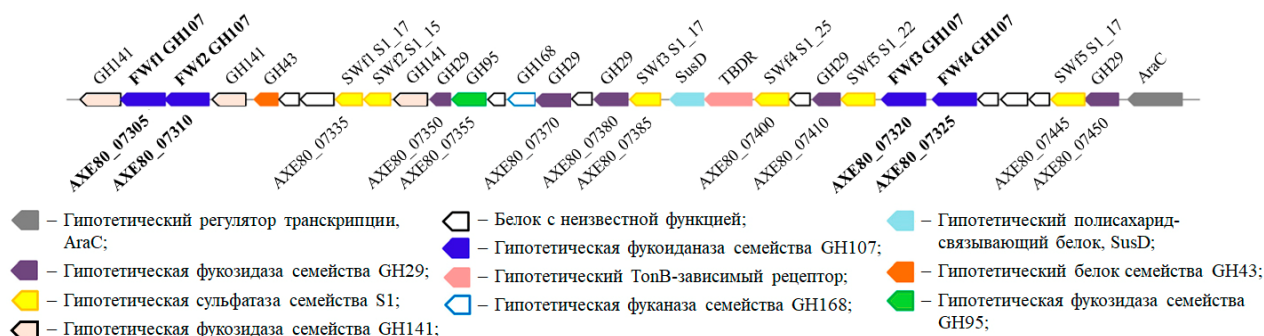


Рисунок 5 – Схематическое изображение фукоидандеградирующего кластера генов морской бактерии

W. fucanilytica CZ1127^T

Многие бактериальные ферменты имеют мультидоменную организацию полипептидных цепей. Такие домены могут выполнять различные функции: каталитические, субстратсвязывающие, сигнальные, регуляторные и другие [141]. Анализ доменной организации предполагаемых фукоиданаз FWf1–4 с помощью CDD и InterProScan показал, что их полипептидные цепи состоят из доменов различных типов. Помимо каталитических доменов семейства GH107, аминокислотные последовательности FWf1–4 содержали по 3–4 дополнительных домена (Рисунок 6).

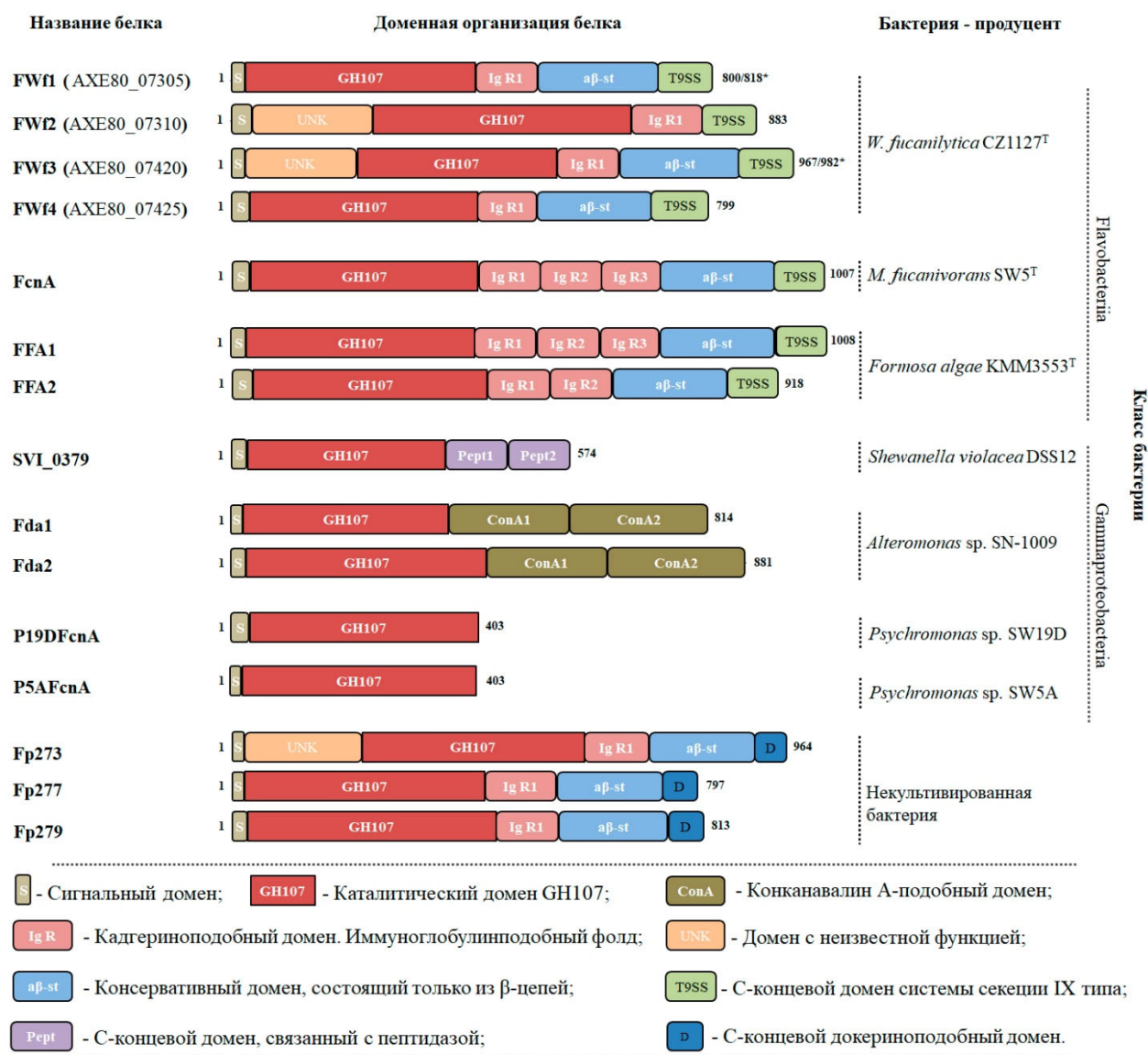


Рисунок 6 – Доменная организация полипептидных цепей FWf1–4 и охарактеризованных фукоиданаз семейства GH107. Длины аминокислотных последовательностей фукоиданаз указаны справа от схематического изображения их доменной организации. Для фукоиданаз FWf1 и FWf3 длины аминокислотных последовательностей указаны как для последовательностей с отсутствующими сигнальными последовательностями (GenBank: ANW96097.1 (FWf1) и ANW96115.1 (FWf3)), так и для последовательностей (*), в которых они присутствуют (GenBank: WP_083194609.1 и WP_083194615.1)

Каждая из гипотетических фукоиданаз FWf1–4 содержала кадгериноподобный домен (IgR) с иммуноглобулиноподобным типом укладки полипептидной цепи. Аналогичные кадгериноподобные домены, расположенные рядом с каталитическим доменом, также присутствуют в полипептидных цепях других фукоиданаз (FcnA из *M. fucanivorans* (GenBank: CAI47003.1), FFA1 и FFA2 из *F. algae* KMM3553^T (GenBank: WP_057784217.1 и WP_057784219.1 соответственно), Fp273, Fp277 и Fp279 из некультивируемой бактерий (GenBank: AYC81238.1, AYC81239.1 и AYC81240.1 соответственно)) [48]. В процессе изучения трехмерной структуры FcnA С. Викерс (С. Vickers) и соавторы предположили, что кадгериноподобные домены Ig R1–3, входящие в состав FcnA, необходимы для принятия удлиненной конформации фермента, которая необходима для экспонирования каталитического домена GH107 в направлении от внешней мембраны бактерии [47].

Домен со структурой, предположительно состоящей из β -тяжей ($\alpha\beta$ -st), был обнаружен в FWf1, FWf3 и FWf4, но не в FWf2. На такую укладку доменов $\alpha\beta$ -st в фукоиданазах также указывают данные, полученные с помощью сервиса AlphaFold (Рисунок 7).

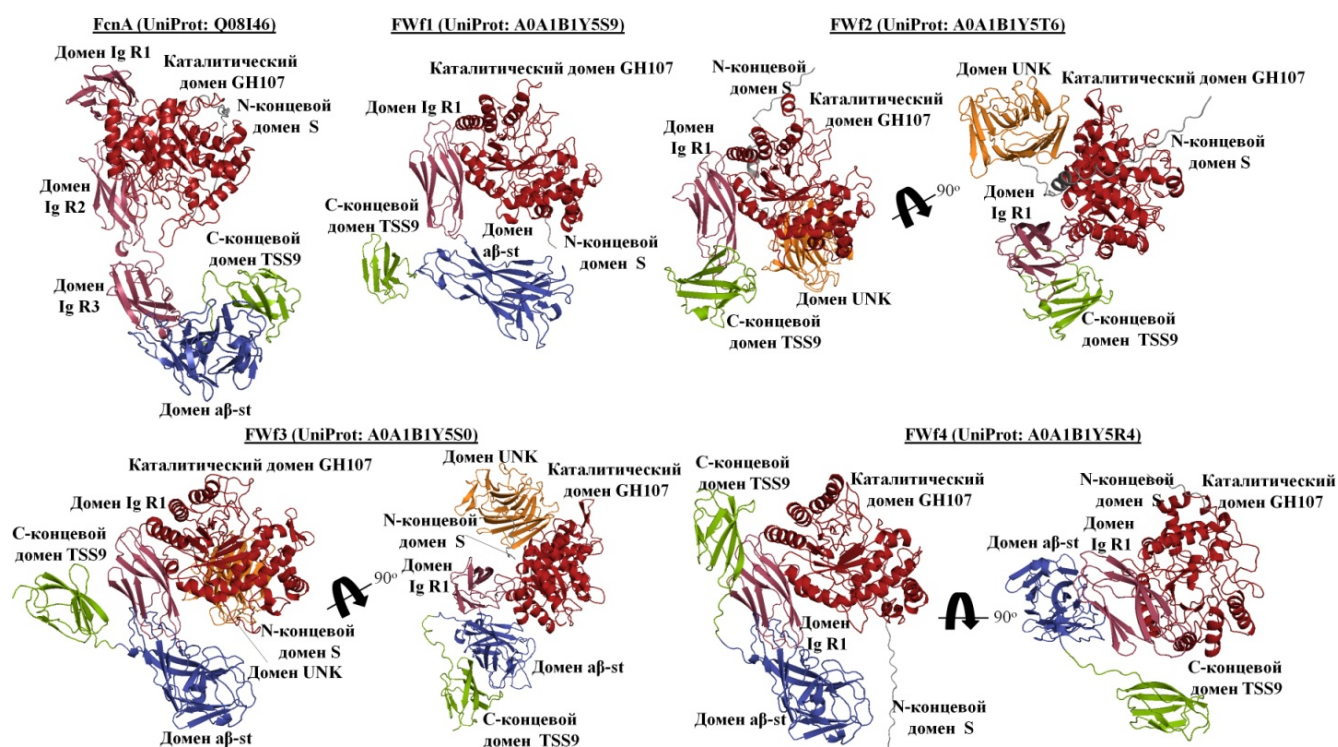


Рисунок 7 –Трехмерные структуры полноразмерных фукоиданаз FWf1–4 и ранее охарактеризованной фукоиданазы FcnA, предсказанные с помощью сервиса AlphaFold. Домены, присутствующие в полипептидных цепях фукоиданаз, обозначены различными цветами. Цветовая маркировка доменов аналогична той, что применяли в Рисунке 5

Подобные домены также были обнаружены в ранее охарактеризованных фукоиданазах FcnA, FFA1, FFA2, Fp273, Fp277 и Fp279. Идентичность аминокислотных последовательностей таких доменов фукоиданаз варьируется от 31 до 90% (Рисунок 8).

A.

Консервативные α -st модули

```

FWF1/524-729 524 - -DTKEEEMSVVIAKVAANTNYGVDQTINMYDWTALDGGKATFKISVNVTFQIGKALS GVS - -GGLTQTQSWGLSGDEREGSKENMYEGEKVDWVT - ISDIQIIEFNANGGTLQESDF 637
FWF3/695-857 693 - - - - -DPIAIKAS SNTNYGLNKKAVMISDVYTAPDGYATFRVSMVDTPPSNKAIVISGIS - -GGTSTQNSWGLG - DGT DANMDDI FTGSDHEWVES INNLQIVDFNANGGDLTEDHF 800
FWF4/525-719 525 - - - - -DPIAIKAS SNTNYGLNKKAVMISDVYTAPDGYATFRVSMVDTPPTDQAI VSGIS - -GGTTTENSWGIG - NGTDGTQDVI FRGSDNEWQNI NNLIQIVDFNANGGDLTEDHF 832
FFA1/732-930 732 - - - - -SDSNVQVKAANNTNYGINTVATMYSETLAPDGMATERISIDVTFTEPFAITSGAS - -GGDS TENSWOMG - DGSTTHQETLFRGSDNQAVENINNIQI I IDFDHGGGSI SEEDI 841
FFA2/639-840 639 DPLDTS DGVAEVEVATFVNYGIGAIATMISSETQATDGLATYKISIDVTPPSDKAVISGLS - -GGVATEYAWGLG - DGTDEHADDFTGSDNEWQMS INNIQI IEFNSGGTEFLDKI 754
FcnA/735-930 735 - - - - -DGNVEIKAFANNTNYGINTVATMYSAVQAPDGLATYKISIDVTFPTDQKIVSGSA - -GGITTTTSWGIG - DGTDAIQNTIFRGSDNEWTES INNIKMWDFNANGGSLTDHV 843
Fp273/726-904 726 - - - - -FSGNTQIFALPNTDYGVDNVVTMOSAVITAPDGLATFQIAFLDTPGAGTNINS - - - - -SATHWGIG - - - - -KKNFVGTADSKVDSITLRLRYVNSANGSDLNEGL 822
Fp277/555-736 555 - - - - -AQIIFAAPNTNYGDDVIATMSSEIQTAPNGVATFQIALDVTTPMAGGSVQSGS - -SSSTTAASWGIG - - - - -ADDIFKGSDDGYQALNNLRITNFNANGSCLTAQNI 654
Fp279/569-753 569 - - - - -LAKVLIQPNHDTYGENVTATMSEIITVPGSVASQIAFDVTFPIGTSITQATDRNGNSDSSWGVS - - - - -TDSLKGSDDNES - SLSLNNIRVTNFQANGC L TSDNI 670

```

```

FWF1/524-729 638 ENITFKSLMIVNQTCLKKIAIAFTIHEETIEIQLGNDSH - PFSIEOD - - - - -KNOTFSIGIGHSVBOSSKRWSEEFILSIDLSE - MLSEVKEKESV 729
FWF3/695-857 801 T - LSFKAITIVNAQSTN - DFVSLKFDQTVVDLQKLGNO - TQOIDLNSVSSIN - -EITFSLGTGN - DSSTNKWVEELISLNLVVDLSTNST - - - - - 857
FWF4/525-719 633 T - LSKAITIVNAQSTN - DFVSLKFDQTVVDLQKLGNO - TQOIDLNSVSSIN - -EITFSLGTGN - DSSTNKWVEELISLNLVVDLSTNST - - - - - 719
FFA1/639-840 842 T - GVFKSITLVNAQAN - DLFSITVESVVSSTPRAALEA - -TETIDLATETGLSDDEITEFIIGTAN - -DATANRWSDDGITWYVVEGYTLSP - - - - - 930
FFA2/639-840 755 S - TAFESVTVVNAQSRN - DRVSLIVNEVRTDLGRSLT - PEAIYVISTSTGVE - -NIQEFIAIGTGN - EELTNKWSIEGNNLVKVFDE - SLSIDD - - - - - 840
FcnA/735-930 844 T - MFKESISIGSBSVN - DFVSLKVGQVISHPGRSANG - YETIDLTATSVS - -NIANFAIGTGN - DSSTNKWVEGTFVDFDA - GTLVITNP - - - - - 930
Fp273/726-904 823 VNSIEENLDLAWGQGV - DRIRVYFTWGLVHSSSHGRTA - -GILDARY - - - - -AGEGDLHLLIDLETN - GAGSMLWQVNSIGWYVIEKND - - - - - 904
Fp277/555-736 655 SNLSNYLEIANGSSN - DRVLVTSNGTENAAAGVVKMPDNPQYDVTY - - - - -GSAGALSNLVLAVGN - -EHTANKWSVNNIATYTSVQT - - - - - 736
Fp279/569-753 671 SKMAIFNAEISNAQSAN - DRVLVTSNGEVNADGGLKMPQSVAPHSNF - - - - -GN - GLVLDVSVFVGN - -ASATNKWSVNYIEMAYQVNDSS - - - - - 753

```

B.

Модули T9SS

```

FWF1/730-900 730 - - - - -VLWPNFTSGVHVFDE - - - - -INPQFIQVYDFNQRLLNSEVSSANY - - - - -LDVSEFNNGVYIFKFRLNNQEVVHKVIVKKN - 800
FWF2/802-853 802 - - - - -WVFPNFTSQVTTISLGNFVVMGEQISTRIYDQIGNLYHRNHIANSSRYLSLVLDGISSGATVFEIKSASINKHHIILK - - - 853
FWF3/833-907 833 IASEKNOTFKVYVNPFTSHIINFN - - - - -IPIHSVEVINTSGKVVKTNPNLTQS - - - - -KILDLSSGVYIIRKGITELGATVVKKIVKNTN 967
FWF4/726-799 720 IVSEKKGQFKVYVNPFTSHIINFN - - - - -IPIHSVEVINTSGKVVKTNPNLTQS - - - - -KISDLSSGVYIIRKGITELGATVVKKIVKNTN 799
FFA1/930-1003 930 DDLYLTGEGRLYVNPATDDELIN - - - - -MPIRSARIMDITGKVVKVVNSSETQN - - - - -LDVSHLATIIFLKGQSEIETVLVKKFVYKRN - 1003
FFA2/840-918 840 DNEHLALSRLYVNPATDELIN - - - - -MPIRSARIMDITGKVVKVVNSSETQN - - - - -LDVSHLATIIFLKGQSEIETVLVKKFVYKRN - 918
FcnA/931-1007 931 - IQDDVDSFKLYPNPAKDRIFIN - - - - -KQPVTWQIFDVTGKLVYVDFKQKNE - - - - -LDISLTKQBLVILKIQTAEENMLFEKFIK - - 1007

```

Рисунок 8 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей доменов α -st (A) и T9SS (B) фукоиданаз FWF1–4 и некоторых других охарактеризованных представителей семейства GH107: FFA1, FFA2, FcnA, Fp273, Fp277 и Fp279

N-концевой домен UNK был предсказан ранее по данным анализа гидрофобных кластеров аминокислотной последовательности фукоиданазы Fp273 [48]. Аналогичный N-концевой домен был обнаружен в FWF2 и FWF3, но отсутствовал в FWF1 и FWF4.

Также с помощью сервиса InterProScan в аминокислотных последовательностях FWF1 и FWF4 были обнаружены C-концевые домены системы секреции IX типа (T9SS) [170]. Наличие доменов T9SS в аминокислотных последовательностях FWF2 и FWF3 удалось выявить, проведя дополнительный анализ с помощью инструмента поиска базы данных CDD. Выравнивание аминокислотных последовательностей C-концевых доменов T9SS FcnA, FFA1, FFA2 и FWF1–4 показано на Рисунке 6. Идентичность между аминокислотными последовательностями C-концевых доменов T9SS фукоиданаз варьируется от 20 до 88%.

Сигнальные последовательности (S) присутствовали почти во всех охарактеризованных фукоиданаз семейства GH107, за исключением FWF1 и FWF3. Ручная аннотация генов *fwf2* и *fwf3* показала, что информация о наличии сигнальных последовательностей, по-видимому, была потеряна во время автоматического предсказания границ генов. Длина недостающих N-концевых аминокислотных участков составляла 18 а. о. для FWF1 и 15 а. о. для FWF3. Таким образом, аминокислотные последовательности фукоиданаз ANW96097.1 (FWF1) и ANW96115.1 (FWF3), депонированных в базе данных CAZy, содержат усеченные с N-конца последовательности FWF1 и FWF3. Полноразмерные последовательности FWF1 и FWF3 депонированы в базе данных GenBank под номерами WP_083194609.1 и WP_083194615.1 соответственно (Приложение 1). Анализ полноразмерных аминокислотных последовательностей FWF1 и FWF3 (WP_083194609.1 и WP_083194615.1) с использованием

сервиса SignalP подтвердил наличие сигнальных последовательностей в обеих предполагаемых фукоиданазах. Таким образом, в большинстве аминокислотных последовательностей фукоиданаз семейства GH107, относящихся к классу Flavobacteriia, одновременно присутствуют N-концевые сигнальные последовательности (S) и C-концевые домены системы секреции (T9SS). Они, предположительно, обеспечивают транслокацию фукоиданаз через внутреннюю и внешнюю мембраны бактерий типа Bacteroidetes. Это подтверждается внеклеточной природой фукоиданазы FcnA, которая была выделена из культуральной питательной среды морских бактерий *M. fucanivorans* и содержит как S, так и T9SS домены (Рисунок 6) [46].

Полученные данные свидетельствуют о том, что большинство описанных фукоиданаз семейства GH107 имеет сложную мультидоменную структуру. При этом состав и количество отдельных доменов, входящих в состав различных фукоиданаз, может различаться. Часть доменов, таких как N-концевой сигнальный пептид (S) и C-концевой домен (T9SS), предопределяют их внеклеточную локализацию. Кадгериноподобные домены (IgR), предположительно, выполняют функцию стержня для принятия правильной (незаслоненной) ориентации каталитического домена GH107 в растворе. К сожалению, функция, выполняемая другими доменами, такими как α -st и UNK, остается неясной, что пока затрудняет достоверную оценку функциональной роли вариаций различных доменов в структурах исследуемых фукоиданаз.

2.1.2 Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фукоиданаз GH107 и FWf1–4

Было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей FWf1–4 и охарактеризованных фукоиданаз GH107 семейства: Fda1 и Fda2 (*Alteromonas* sp. SN-1009, GenBank: AAO00508.1 и AAO00509.1), FFA1 и FFA2 (*F. algae* KMM3553^T, GenBank: WP_057784217.1 и WP_057784219.1), FcnA (*M. fucanivorans*, GenBank: CAI47003.1), P5AFcnA и P19DFcnA (*Psychromonas* sp. SWA5, GenBank: AYP59291.1 и AYP59292.1), Fp273, Fp277 и Fp279 (некультивируемые бактерии, GenBank: AYC81238.1, AYC81239.1 и AYC81240.1), SVI_0379 (*Shewanellaviolacea* DSS12, GenBank: BAJ00350.1). Показано, что данные фукоиданазы имели различные значения идентичности их аминокислотных последовательностей (от 15 до 79%) (Приложение 2, Таблица 1). Идентичность аминокислотных последовательностей FWf1–4 между собой составляет от 37 до 51%. Наибольший процент идентичности аминокислотных последовательностей каталитического домена GH107 фукоиданаз FWf1–4 из *W. fucanilytica* наблюдался с охарактеризованными фукоиданазами Fp277 и Fp273 из некультивируемых бактерий и FFA1 из *F. algae*. Идентичность аминокислотных последовательностей Fp277 с

FWf1 составляет 68%, Fp273 с FWf2 и FWf3 составляет 52% и 70% соответственно, FFA1 с FWf4 – 79% (Приложение 2, Таблица 2). Также были идентифицированы аминокислотные мотивы RxxxxxxDxxxxD и DxxxGH, которые являются высококонсервативными для всех известных представителей семейства GH107 (Рисунок 9).

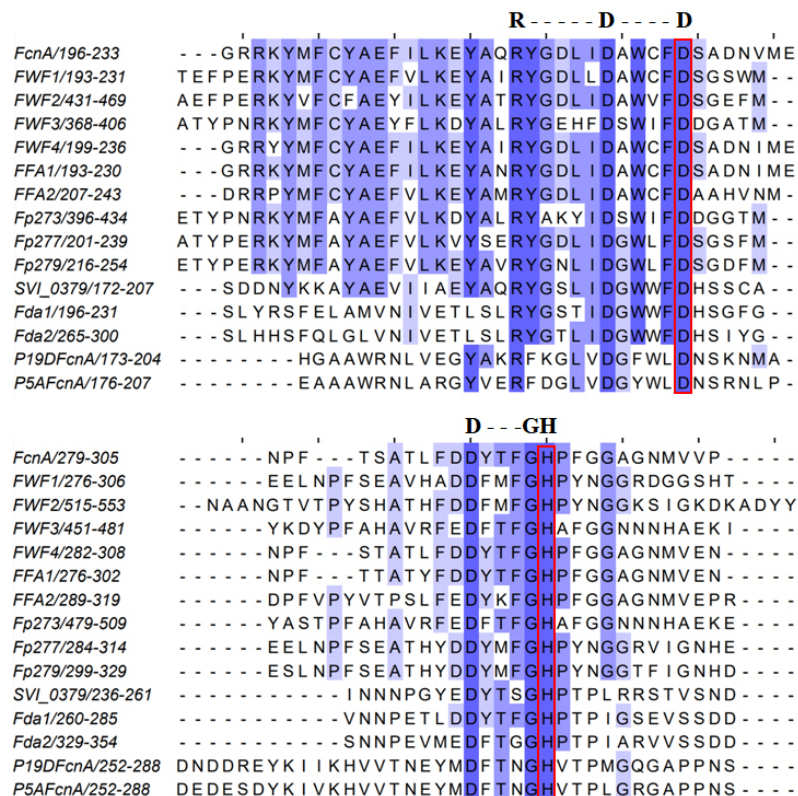


Рисунок 9 – Область множественного выравнивания каталитических доменов фукоиданаз FWf1–4 и известных белков семейства GH107. Остатки каталитических аминокислот Asp и His отмечены красными рамками. Сигнатуры аминокислот RxxxxxxDxxxxD и DxxxGH, консервативные для всех известных представителей семейства GH107, указаны в верхней части последовательностей

В состав данных аминокислотных сигнатур входят две каталитические аминокислоты, идентифицированные ранее в FcnA, Asp (D) и His (H), выполняющие роли нуклеофила и кислоты-основания в каталитической триаде [47]. Множественное выравнивание позволило определить расположение данных аминокислотных остатков в предполагаемых фукоиданаз FWf1 (Asp225 и His293), FWf2 (Asp464 и His537), FWf3 (Asp401 и His469) и FWf4 (Asp229 и His297) (Рисунок 9).

Структурное выравнивание пространственных моделей фукоиданаз FWf1–4 и охарактеризованной фукоиданазы FcnA (шифр PDB: 6DLH) позволило выявить некоторые отличия в организации их каталитических центров. Состав и расположение аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра FWf4, были практически идентичными таковым в активном центре фукоиданазы FcnA. Активные центры FWf1, FWf2 и FWf3 имели значительные отличия от активного центра FcnA (Рисунок 10). Помимо высококонсервативных

остатков Asp и His, в активных центрах данных фукоиданаз было отмечено большое количество переменных аминокислотных остатков (Рисунок 10). Предположительно, данные остатки аминокислот отвечают за распознавание моносахаридных остатков определенной структуры или остатков L-фукозы с определенным сульфатированием. Полученные данные позволяют предположить, что субстратная специфичность фукоиданаз FWf1, FWf2 и FWf3 может иметь значительные отличия от специфичности ранее охарактеризованной фукоиданазы FcnA.

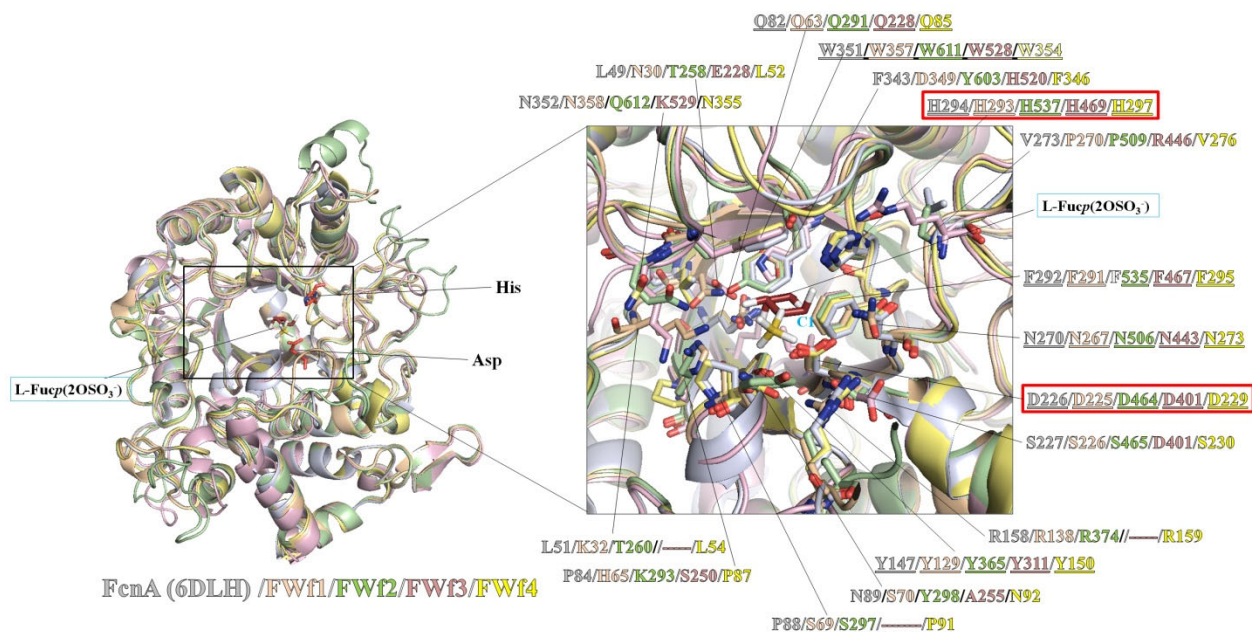
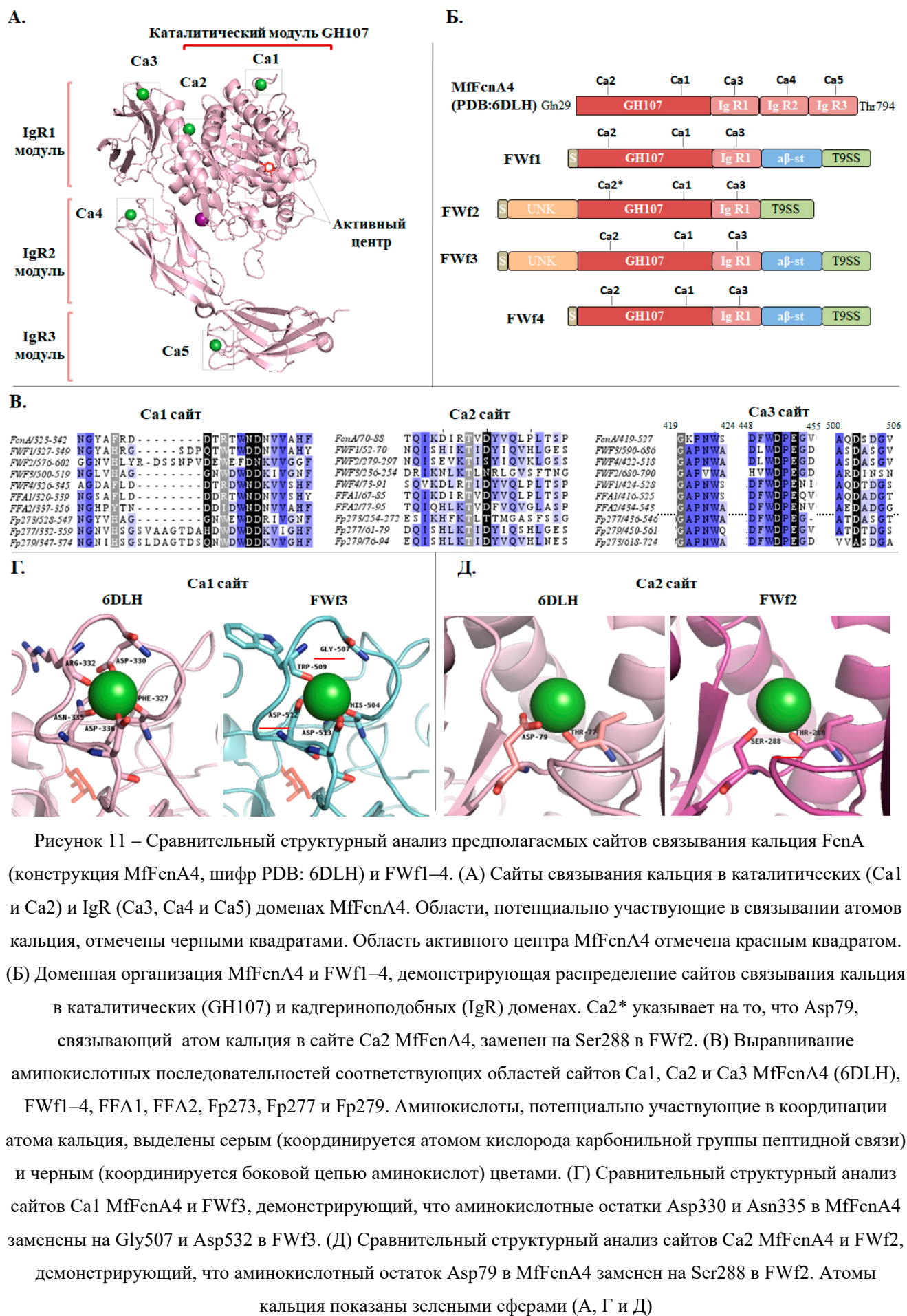


Рисунок 10 – Структурное выравнивание трехмерных моделей каталитических доменов GH107 фукоиданаз FWf1–4 и фукоиданазы FcnA (шифр PDB: 6DLH). Остатки аминокислот активных центров FWf1–4 и FcnA, являющиеся консервативными, подчеркнуты. Остатки Asp и His, выполняющие каталитическую функцию, выделены красными рамками

Структура FcnA (шифр PDB: 6DLH) содержит пять атомов кальция, два из которых находятся в каталитическом домене и три – в кадгериноподобных доменах IgR [47] (Рисунок 11, А). Поскольку доменная организация фукоиданаз FWf1–4 включает каталитический домен GH107 и только один домен IgR, то их полипептидные цепи могут содержать только по три потенциальных сайта связывания кальция, обозначенные нами как Ca1, Ca2 и Ca3 (Рисунок 11, Б). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей FcnA, FFA1, FFA2, Fr273, Fr277, Fr279 и FWf1–4, а также структурное выравнивание пространственных моделей FWf1–4 и FcnA позволили выявить различия в структуре кальций связывающих участков фукоиданаз. Показано, что сайты связывания Ca3, расположенные в домене IgR, являются консервативными, в то время как структуры сайтов связывания Ca1 и Ca2, расположенных в каталитическом домене, могут значительно различаться у различных фукоиданаз (Рисунок 11, В, Г и Д).



2.2 Получение рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

Для подтверждения предполагаемой функции генов *fwf1–4* морской бактерии *W. fucanilytica* и выяснения различий между ними нами были получены рекомбинантные продукты этих генов.

2.2.1 Получение генетических конструкций фукоиданаз FWf1–4

Ранее было показано, что N-концевые сигнальные пептиды и C-концевые домены не участвуют в каталитическом акте, и укорочение доменов T9SS увеличивает уровень экспрессии фермента FcnA, а также препятствует разрушению фукоиданаз Fda1 и Fda2 протеазами без существенного изменения их каталитической активности [46, 128]. Удаление кадгериноподобных доменов IgR в FcnA приводило к экспрессии нерастворимого рекомбинантного белка, что, по предположению авторов, свидетельствует либо о неправильном определении границ доменов, либо о значительной роли доменов IgR в стабилизации фермента.

При дизайне рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4 были созданы конструкции, в которых у FWf2 укорочен только N-концевой сигнальный пептид (S), а у FWf1, FWf3 и FWf4 укорочены как S-, так и T9SS-домены (Рисунок 12). Открытые рамки считывания полученных генетических конструкций содержали укороченные гены *fwf1* (Ile2 – Pro733), *fwf2* (Gln36 – Asn883), *fwf3* (Leu2 – Tyr899) и *fwf4* (Ala33 – Val730) и C-концевую последовательность полигистидиновой метки (6×His), кодируемую плазмидой (Рисунок 12).

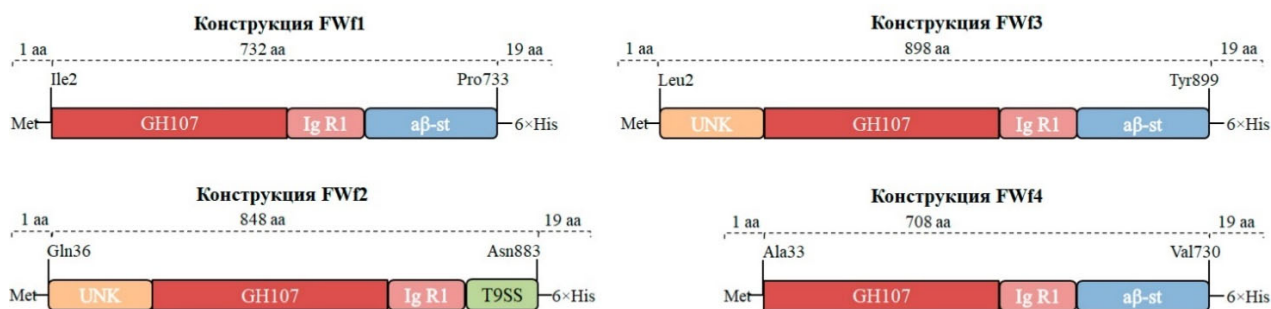


Рисунок 12 – Схематическое изображение конструкций, кодирующих FWf1 (Ile2-Pro733), FWf2 (Gln36-Asn883), FWf3 (Leu2-Tyr899) и FWf4 (Ala33-Val730)

2.2.2 Оптимизация экспрессии и выделение рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4

2.2.2.1 Выбор штамма – продуцента фукоиданаз FWf1–4

Был оценен уровень экспрессии целевых рекомбинантных фукоиданаз в нескольких штаммах *E. coli*, имеющих различные генотипы. Уровень продукции целевых рекомбинантных белков в штаммах продуцентах оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в 12%-ном геле. Показано, что уровень экспрессии рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4 в различных штаммах *E. coli* значительно различался. Самый высокий уровень экспрессии рекомбинантных

фукоиданаз наблюдался при использовании в качестве продуцента штамма ArcticExpress (DE3). В штаммах BL21-Star (DE3) pLysS, BL21-Gold (DE3) pLysS и BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL уровень экспрессии FWf1–4 был значительно ниже (Рисунок 13, А).

Не было замечено существенной разницы в уровне экспрессии целевых белков клетками ArcticExpress (DE3) при их культивировании в питательной среде для автоиндукции ZYP5052 или питательной среде LB с добавлением индуктора экспрессии ИПТГ (Рисунок 13, Б). При двукратном увеличении концентрации индуктора экспрессии ИПТГ при культивировании в LB так же не отмечено заметного влияния на продукцию целевых белков клетками бактерий (Рисунок 13, В).

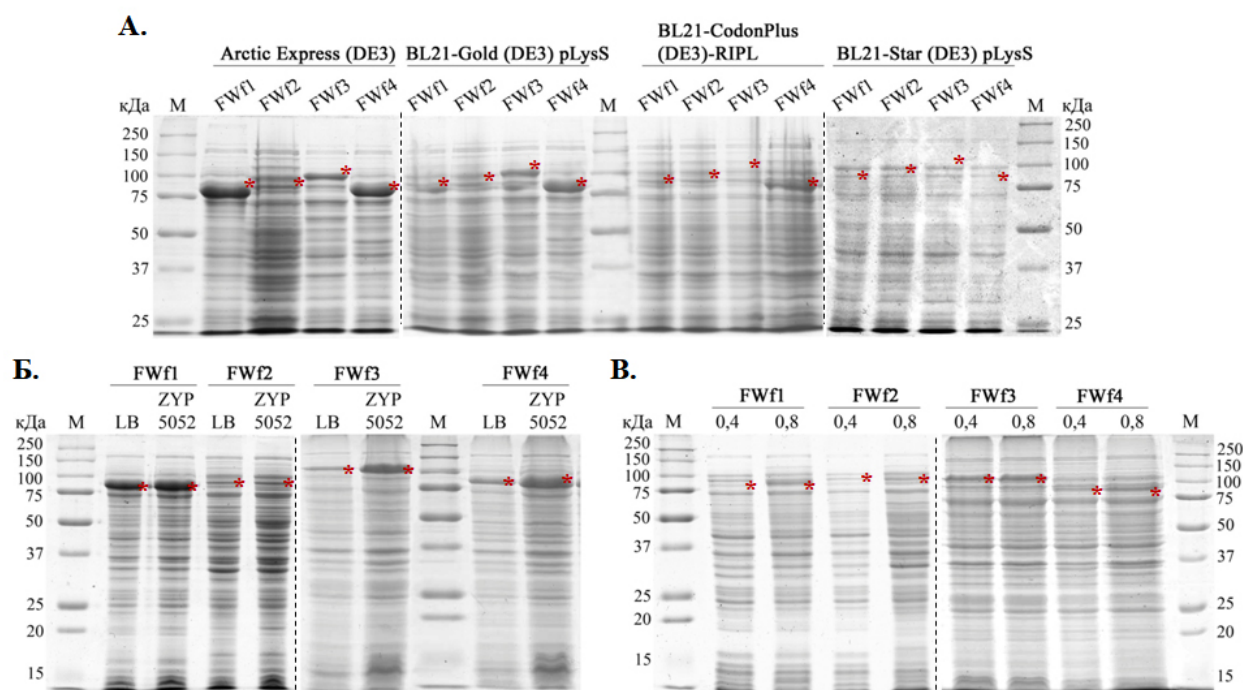


Рисунок 13 – (А) ДСН-ПААГ-электрофореграмма лизата клеток *E. coli* (компетентных штаммов ArcticExpress (DE3), BL21-Gold (DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)RIPL или BL21-Star (DE3)pLysS), трансформированных плазмидами *ret-22b/fwf1-4*. (Б) ДСН-ПААГ-электрофореграмма лизата клеток *E. coli* ArcticExpress (DE3), демонстрирующей влияние среды LB или ZYP5052 на продукцию рекомбинантных FWf1–4. (В) ДСН-ПААГ-электрофореграмма лизата клеток *E. coli* ArcticExpress (DE3), демонстрирующей влияние концентрации индуктора экспрессии ИПТГ на продукцию рекомбинантных FWf1–4. Основные полосы, которые соответствуют ожидаемым молекулярным массам FWf1 (83,1 кДа), FWf2 (96,3 кДа), FWf3 (101,7 кДа) или FWf4 (80,0 кДа) обозначены звездочками. М – маркер молекулярной массы белков

По результатам проведенного анализа, в качестве системы для получения целевых рекомбинантных ферментов был выбран коммерческий штамм *E. coli* Arctic Express (DE3). В дальнейшем бактерии, трансформированные рекомбинантными плазмидами, наращивали в

питательной среде LB и индуцировали экспрессию генов 0,4 М ИПТГ. Все рекомбинантные белки FWf1–4 продуцировались в растворимой форме.

2.2.2.2 Выделение и очистка рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4

Все исследуемые рекомбинантные фукоиданазы содержали в своих последовательностях С-концевой полигистидиновый участок, который позволяет использовать для их очистки металл-аффинную хроматографию. Бактериальные экстракты, содержащие фукоиданазы, подвергали Ni²⁺-аффинной хроматографии с последующим обессоливанием с помощью гельпроникающей хроматографии. Чистоту полученных препаратов рекомбинантных фукоиданаз оценивали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в 12%-ном геле. По результатам ДСН-ПААГ-электрофореза каждый из полученных препаратов фукоиданаз содержал преимущественно одну полосу, которая соответствовала расчетным значениям молекулярной массы фукоиданаз. Молекулярные массы полученных белков были определены с помощью денситометра и составляли ~84±2 кДа для FWf1, ~97±3 кДа для FWf2, ~100±2 кДа для FWf3 и ~81±3 кДа для FWf4, что соответствовало рассчитанным молекулярным массам усеченных форм фукоиданаз FWf1–4 (83,1 кДа, 96,3 кДа, 101,7 и 80,0 кДа соответственно) (Рисунок 14). Выход белков после очистки в пересчете на 1 литр LB составил 7,2 мг, 3,7 мг, 2,8 мг и 5,8 мг для FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 соответственно.

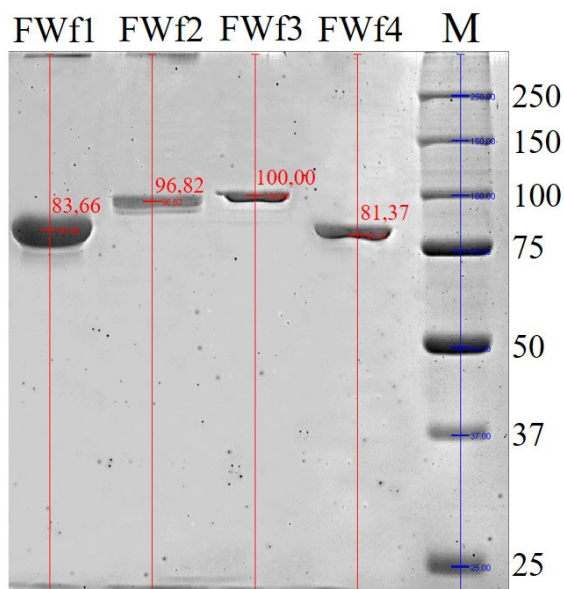


Рисунок 14 – ДСН-ПААГ-электрофореграмма фукоиданаз FWf1–4, полученных после очистки и обессоливания. Красным подписаны молекулярные массы, рассчитанные с помощью программного обеспечения QuantityOne 4.6.7. М – маркер молекулярной массы белков

2.3 Оптимальные условия проявления каталитической активности рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4

Изучение физико-химических свойств ферментов является необходимым начальным этапом, позволяющим в дальнейшем эффективно их применять. Для определения условий, при которых фукоиданазы FWf1–4 проявляют наибольшую ферментативную активность, в качестве субстрата был использован фукоидан (FeF) из бурой водоросли *F. evanescens*, поскольку каждый из ферментов способен катализировать гидролиз данного фукоидана (см. раздел 2.5.1). Метод Нельсона-Сомоджи, используемый для определения количества восстанавливающих сахаров, оказался неприменим в случае исследуемых фукоиданаз (данные не показаны). Поэтому для детектирования и анализа ферментативной активности нами был использован электрофорез в ПААГ. Активность детектировали по формированию на электрофореграмме полос сульфатированных олигосахаридов, образующихся в результате ферментативного гидролиза фукоидана.

Катионы некоторых металлов способны модулировать каталитическую активность многих фукоиданаз [23], поэтому растворы солей металлов могут быть использованы в дальнейшем для управления ферментативным процессом, для увеличения или снижения каталитической активности в зависимости от необходимости.

Известно, что многим фукоиданазам семейства GH107 для проявления ферментативной активности необходимо присутствие некоторых ионов металлов [46, 51, 52]. Наличие специфических сайтов для связывания атомов кальция в структурах фукоиданаз может указывать на важную роль этого катиона в каталитическом процессе.

Исследование влияния различных солей ионов мультивалентных металлов на активность обессоленных FWf1–4 показало, что из четырех исследуемых фукоиданаз только FWf3 способна проявлять ферментативную активность без добавления в реакционную смесь ионов металлов (Рисунок 15, Б). Фукоиданазы FWf1, FWf2 и FWf4 проявляли ферментативную активность при добавлении ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} или Ba^{2+} в реакционную смесь. Добавление ионов Mn^{2+} активировало только фукоиданазу FWf4. Все исследуемые фукоиданазы не проявляли ферментативную активность при добавлении ионов других металлов, таких как Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} или Sn^{2+} (Рисунок 15, Б).

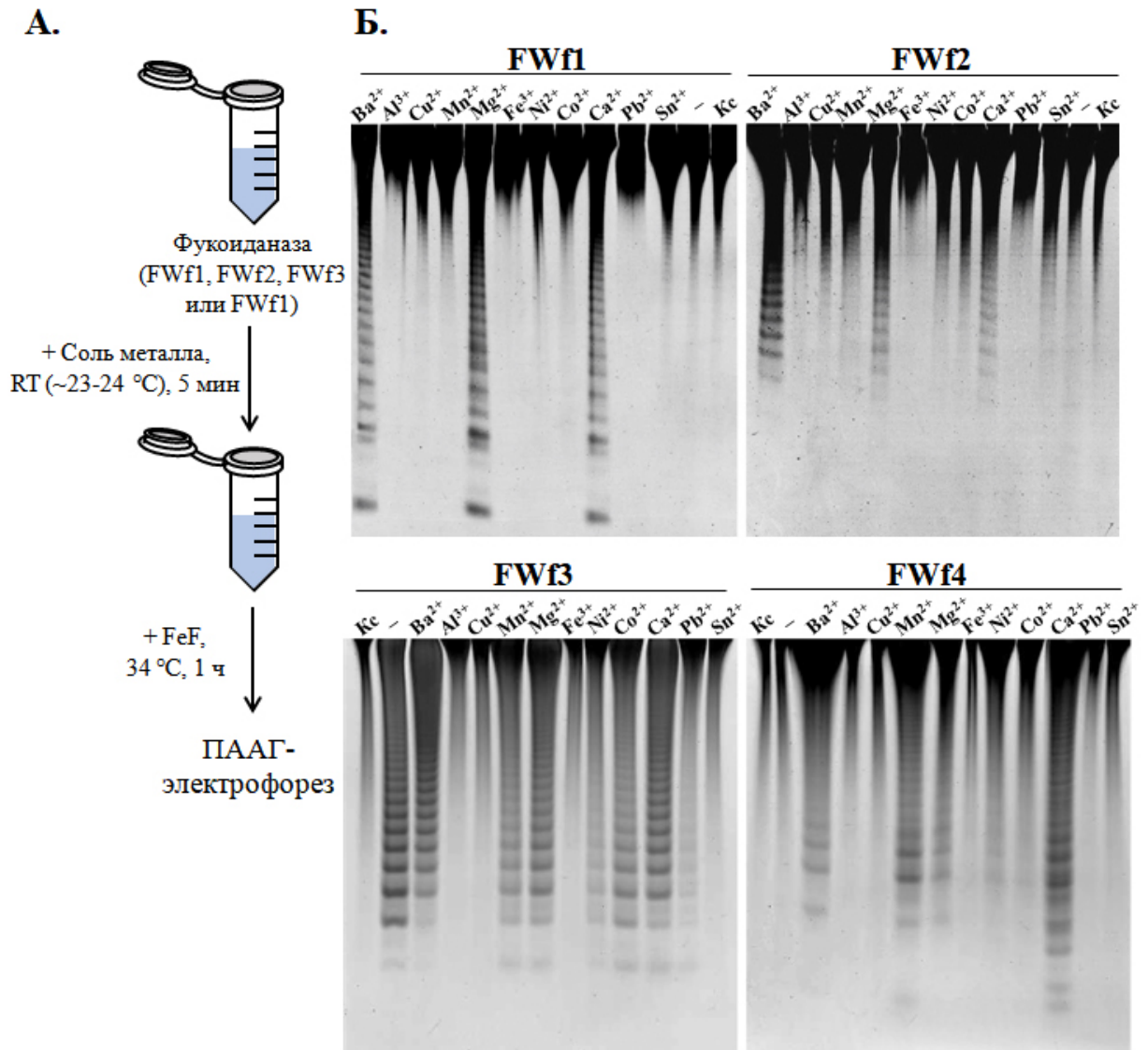


Рисунок 15 – (А) Общая схема проведения анализа влияния солей металлов на ферментативную активность FWf1–4. (Б) Электрофореграмма, демонстрирующая влияние различных солей металлов (5 мМ) на способность FWf1–4 к деполимеризации фукоидана FeF. (—) – контроль активности обессоленных ферментов. Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся ферментативному гидролизу

Для исследования ингибирующего действия ионов мультивалентных металлов, фукоиданазы FWf1–4 предварительно инкубировали с активирующим их CaCl_2 (5 мМ), а затем добавляли другие ионы металлов (Рисунок 16, А). Показано, что полностью ингибировали специфическую активность всех исследуемых фукоиданаз катионы Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} и Sn^{2+} . Ионы Co^{2+} ингибировали активность только FWf1 и FWf2, но не FWf3 и FWf4. Присутствие ионов Mn^{2+} в реакционной смеси значительно снижало активность FWf2, но не фукоиданаз FWf1, FWf3 и FWf4 (Рисунок 16, Б).

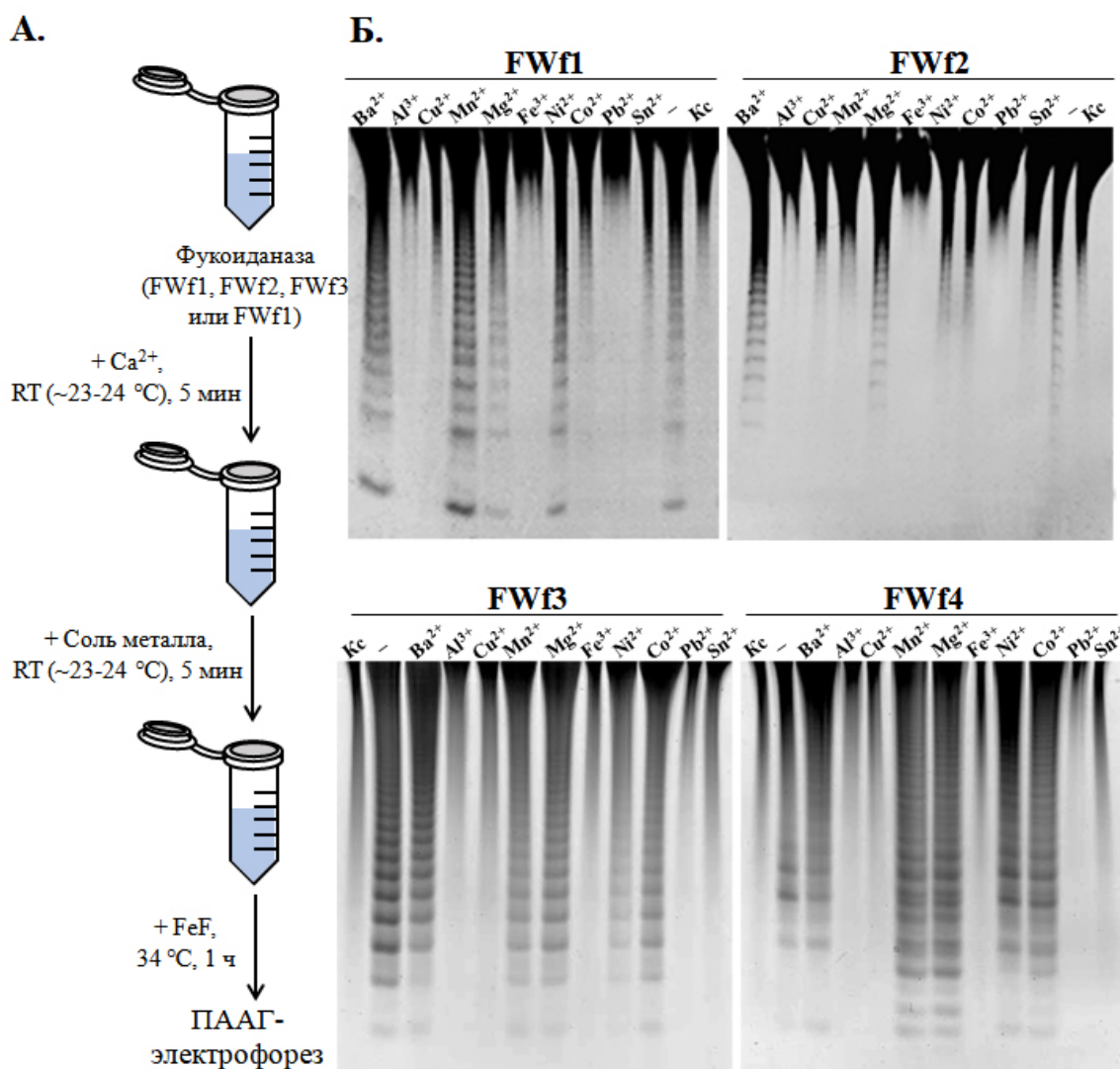
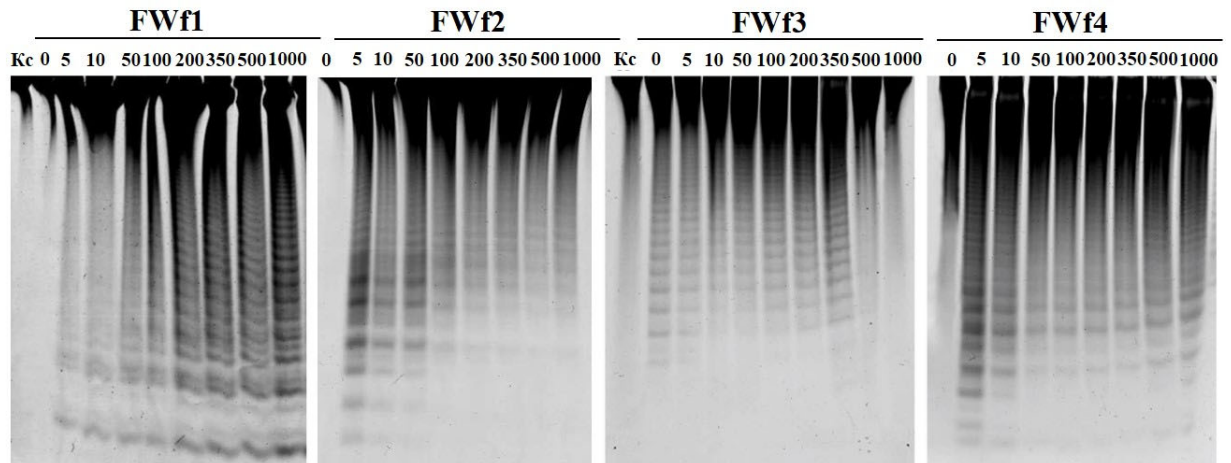


Рисунок 16 – (А) Общая схема проведения анализа влияния солей металлов на ферментативную активность FWf1–4, предварительно инкубированных с 5 мМ CaCl₂. (Б) Электрофореграмма, демонстрирующая влияние различных солей металлов (5 мМ) на способность предварительно инкубированных с 5 мМ CaCl₂ FWf1–4 к деполимеризации фукоидана FeF. (—) – контроль активности FWf1–4, предварительно инкубированных с 5 мМ CaCl₂. Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся ферментативному гидролизу

Добавление в реакционную смесь хлорида кальция в концентрациях 5–1000 мМ оказывало различное действие на активность исследуемых фукоиданаз. Ферментативная активность FWf1 с ростом концентрации хлорида кальция также увеличивалась. Обратная ситуация наблюдалась для фукоиданаз FWf2 и FWf4. Увеличение концентрации хлорида кальция выше 5 мМ приводило к значительному снижению ферментативной активности этих двух фукоиданаз. Специфическая активность FWf3 не увеличивалась в присутствии CaCl₂, более того, при увеличении концентрации CaCl₂ от 500 мМ и выше происходило полное ингибирование активности данного фермента (Рисунок 17, А).

A.



Б.

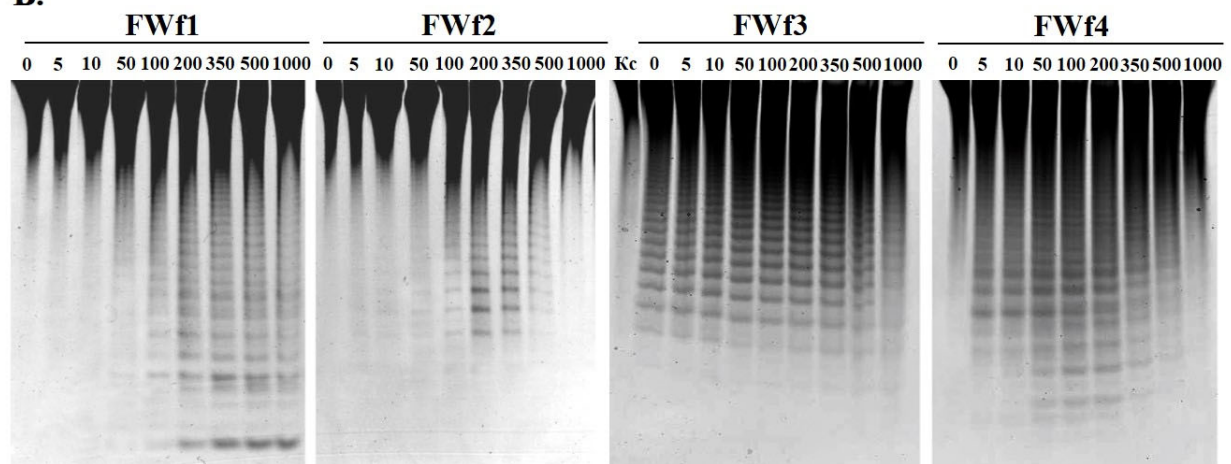


Рисунок 17 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана FeF (из бурой водоросли *F. evanescens*), полученных с помощью фукоиданаз FWf1–4 при добавлении в реакцию смесь различных концентраций CaCl_2 (А) или NaCl (Б). Концентрации (мМ) CaCl_2 и NaCl обозначены над гелями. Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся ферментативному гидролизу

Как и в случае с хлоридами кальция, магния и бария, присутствие хлорида натрия в реакционной смеси приводило к появлению ферментативной активности у фукоиданаз FWf1, FWf2 и FWf4. Однако для этого требовались значительно большие концентрации данной соли, чем для хлоридов щелочноземельных металлов. Наибольшую активность фукоиданазы FWf2 и FWf4 проявляли в присутствии 200–350 мМ и 50–200 мМ NaCl соответственно. Увеличение концентрации хлорида натрия свыше 350 мМ и 200 мМ приводило к подавлению активности фукоиданаз FWf2 и FWf4 соответственно. Фукоиданазы FWf1 и FWf3 демонстрировали устойчивость к присутствию NaCl в реакционной смеси в концентрациях до 1 М (Рисунок 17, Б).

Полученные данные свидетельствуют, что фукоиданазы FWf1, FWf2 и FWf4 не способны катализировать гидролиз фукоидана без дополнительных компонентов, таких как

соли некоторых двухвалентных металлов или NaCl в реакционной смеси. Аналогичные наблюдения были сделаны в отношении фукоиданаз FFA1 и FFA2 из морской бактерии *F. algae*, которые проявляли активность только после добавления солей некоторых металлов [51, 52]. Исключением является фукоиданаза FWf3, которая проявляет ферментативную активность без добавления в реакционную смесь каких-либо ионов металлов.

Способность фукоиданаз проявлять ферментативную активность в присутствии различных моно- и мультивалентных металлов указывает на невысокую селективность данных ферментов к определенным катионам металлов. Это резко отличается от свойств металлзависимых ферментов, которые, как правило, активируются определенным катионом металла [171, 172]. Удаление ионов металлов (ионов Ca^{2+}) из препаратов фукоиданаз FWf1, FWf2 и FWf4 с помощью гелпроникающей хроматографии приводило к их полной инактивации. Последующее добавление хлорида кальция к растворам фукоиданаз возвращало их каталитическую активность (Рисунок 18). Полученные данные могут косвенно указывать на неспособность кальцийсвязывающих участков, присутствующих в структурах фукоиданаз (Рисунок 10), прочно удерживать атомы кальция или же данные участки не принимают прямого участия в катализе. Вероятно, ионы металлов необходимы для стабилизации данных ферментов и придания им необходимой конформации. Другим объяснением может быть то, что вследствие полианионной природы фукоиданов некоторые катионы металлов потенциально способны влиять на их конформацию в растворе. Определенная конформация фукоиданов, в свою очередь, может являться необходимым условием для его дальнейшего расщепления фукоиданазами. Эта гипотеза может объяснить то, что несмотря на схожесть в строении некоторых кальцийсвязывающих участков, одним фукоиданазам для гидролиза фукоидана необходимо присутствие ионов металлов, а другим – нет. Однако для того, чтобы сделать однозначные выводы о механизме вовлечения ионов металлов в процесс деполимеризации фукоиданов представителями семейства GH107, необходимы дальнейшие структурные исследования данных ферментов с привлечением сайт-направленного мутагенеза и рентгеноструктурного анализа.

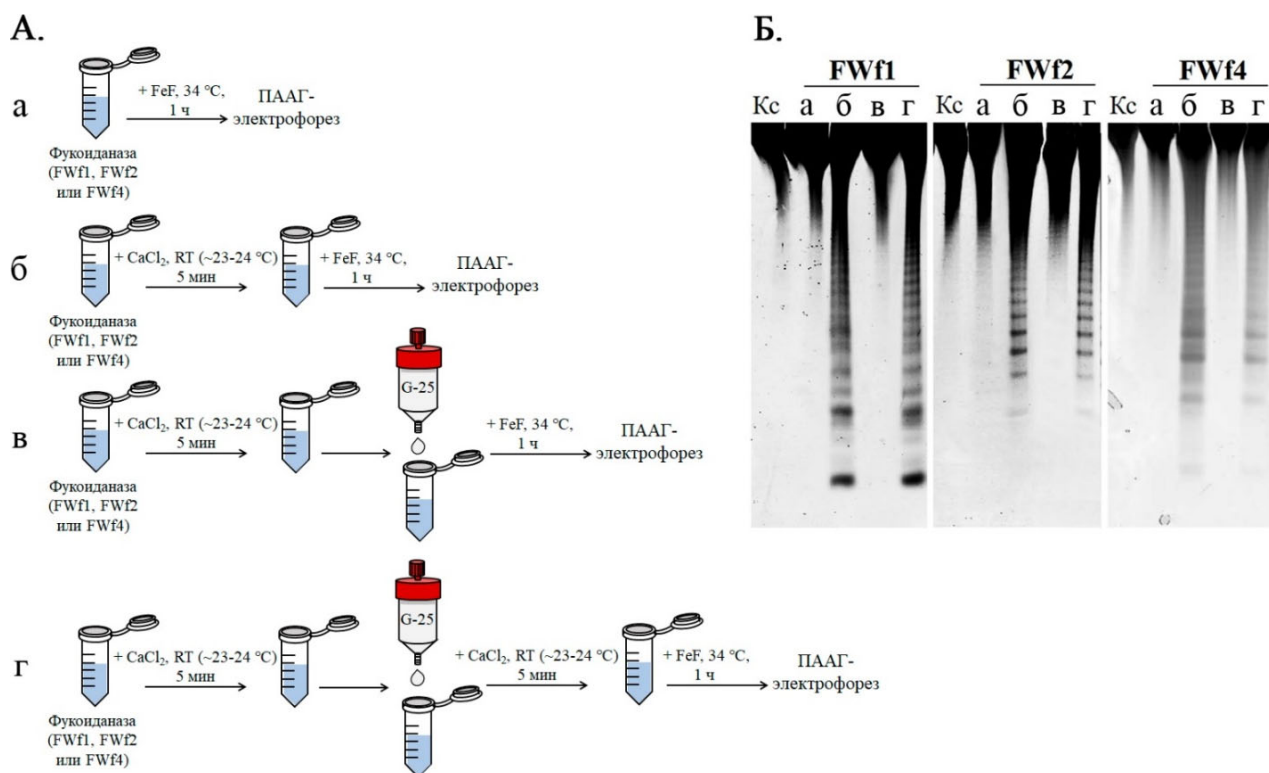


Рисунок 18 – (А) Общая схема проведения анализа активности фукоиданаз FWf1, FWf2 и FWf4 без добавления CaCl₂ в реакционную смесь «а», с добавлением 5 mM CaCl₂ «б», после «б» и последующим обессоливанием на колонке с Sephadex G-25 «в», после «в» и последующим добавлением 5 mM CaCl₂ «г». (Б) Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана FeF, полученных с помощью фукоиданаз FWf1, FWf2 и FWf4 в соответствии со схемами «а», «б», «в» и «г». Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся ферментативному гидролизу

На ферментативную активность фукоиданаз, как и на активность большинства ферментов, существенное влияние оказывают pH буферных растворов и температура. Образование наибольшего количества низкомолекулярных продуктов гидролиза фукоидана наблюдалось при pH 6,4–7,2 для FWf1, pH 6,0–7,2 для FWf2, pH 6,4–6,8 для FWf3 и pH 6,0–6,4 для FWf4 (Рисунок 19, А). Оптимумы pH фукоиданаз из бактериальных источников, как правило, находятся в диапазоне от слабокислой до слабощелочной среды (pH 6–8), за исключением фукоиданаз Fun174A из бактерии *W. aestuarii* OF219 (pH-оптимум 5,5) [24], FFA2 из *F. algae* (pH-оптимум 6,5–9) [52] и OUC-FaFcn1 из *F. algicola* 12076 (pH-оптимум 9) [53].

Диапазон температур, при которых бактериальные фукоиданазы проявляют наибольшую активность, очень широк и варьирует от 20 °C (FcnA из *M. fucanivorans* SW5 [30]) до 45 °C (фукоиданазы из *Vibrio* sp. No.5 [27] и фукоиданазы Fhf2Δ484 из *F. haliotis* [50]). Фукоиданазы FWf1 и FWf2 продемонстрировали наибольшую активность при температурах от 24 °C до 40 °C, а FWf3 и FWf4 при температурах от 40 °C до 50 °C (Рисунок 19, Б). Значения уровня pH и температуры для проявления активности FWf1–4 являются типичными для фукоиданаз, выделенных из морских бактерий [23].

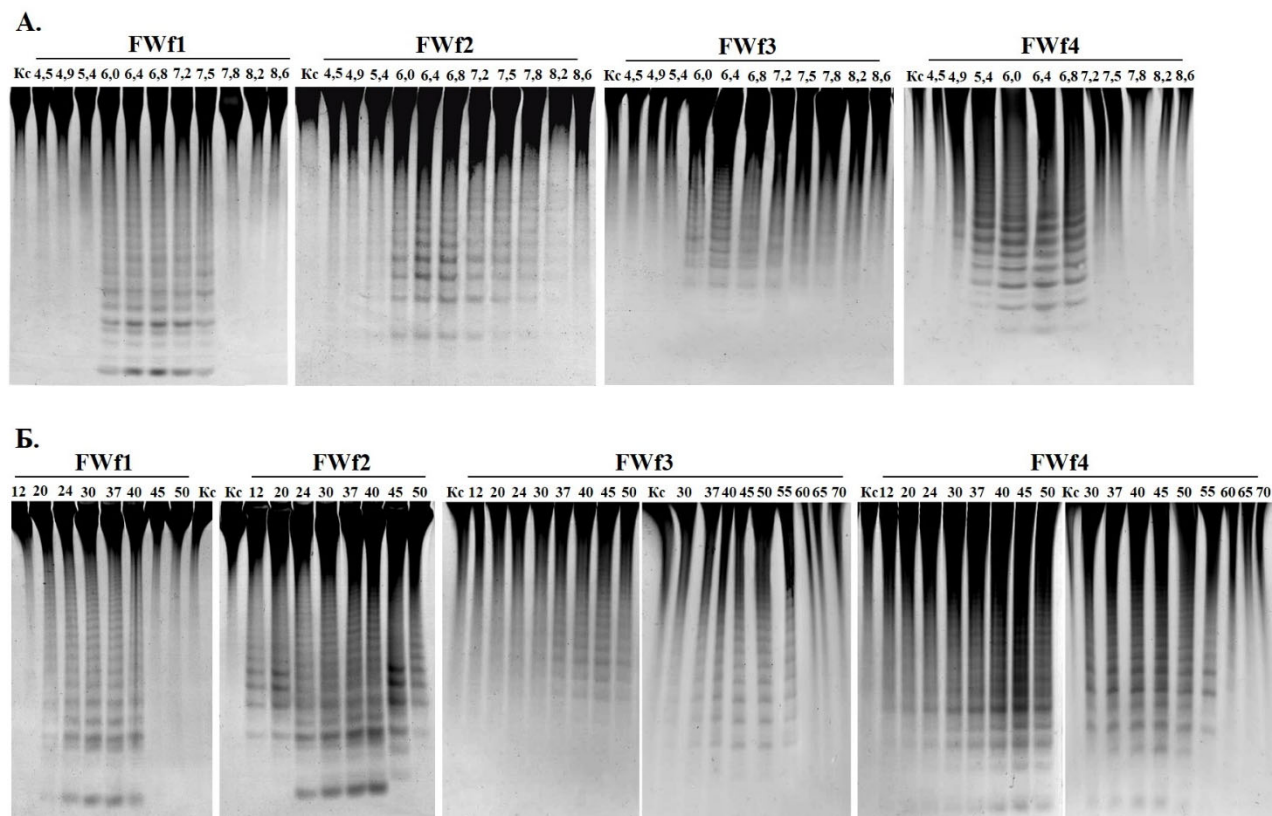


Рисунок 19 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, полученных с помощью фукоидаз FWf1–4 при различных значениях pH реакционной смеси (А) и при различных температурах инкубации (Б). Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся гидролизу

2.4 Определение типа действия рекомбинантных фукоидаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

Анализ ферментативной деполимеризации фукоидана с течением времени позволяет определить одну из важнейших характеристик О-гликозидгидролаз, а именно тип действия фермента. О-Гликозидгидролазы экзо-типа, как правило, катализируют отщепление моно- или дисахарида с невосстанавливающего или восстанавливающего конца молекулы субстрата, образуя один и тот же продукт реакции на протяжении всего процесса гидролиза. О-Гликозидгидролазы эндо-типа, напротив, катализируют гидролиз гликозидных связей внутри углеводной цепи фукоидана. Таким образом, с началом процесса ферментативного гидролиза происходит образование разнообразных по степени полимеризации продуктов реакции. Все четыре исследуемых фукоидазы FWf1–4 катализировали гидролиз фукоидана из *F. evanescens* по эндо-типу, что подтверждается образованием большого набора разнообразных сульфатированных олигосахаридов на ранних этапах ферментативного гидролиза (Рисунок 20).

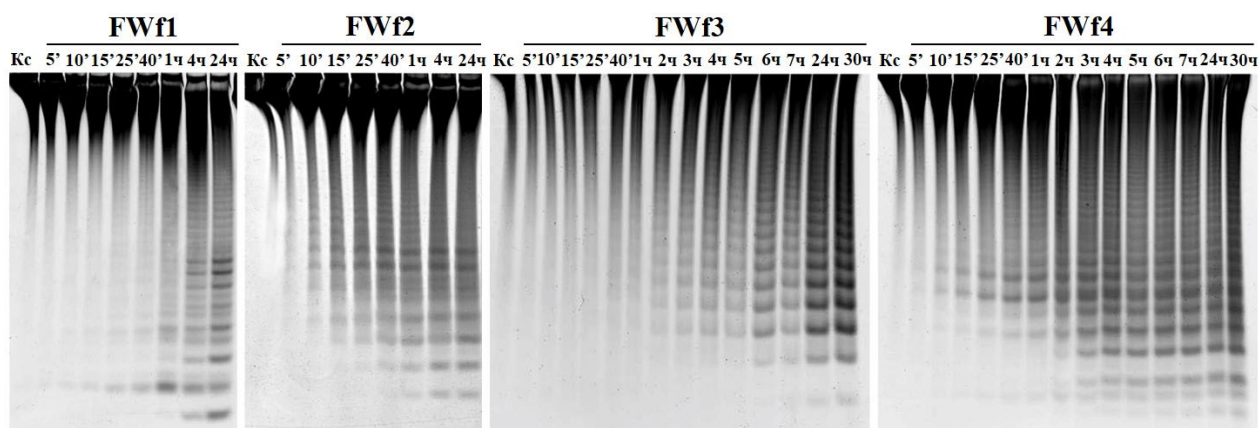


Рисунок 20 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, полученных с помощью фукоиданаз FWf1–4, за разное время инкубирования. Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся гидролизу

2.5 Определение субстратной специфичности рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

2.5.1 Действие фукоиданаз FWf1–4 на фукоиданы, выделенные из различных видов бурых водорослей

Было изучено действие полученных рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоиданам, выделенным из различных видов бурых водорослей. Эти фукоиданы различались расположением сульфатных групп при остатках α -L-фукозы, моносахаридным составом и структурой основной цепи. Некоторые структурные характеристики использованных фукоиданов были определены нами и представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Структурные характеристики фукоиданов бурых водорослей использованных в экспериментах

Источник фукоидана (вид бурой водоросли)	Название фракции фукоидана	-SO ₃ Na, %*	Моносахаридный состав, моль%						
			L-Fuc	L-Rha	D-Gal	D-Glc	D-Man	D-Xyl	UA
<i>F. evanescens</i>	FeF	26	95,7	1,4	1,7	0,6	0,6	0,0	0,0
<i>F. vesiculosus</i> (Sigma-Aldrich)	FvF	18	89,9	0,0	6,9	0,0	3,2	0,0	0,0
<i>S. cichorioides</i>	ScF	30	99,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>S. horneri</i>	ShF	21	91,7	0,0	8,3	0	0,0	0,0	0,0

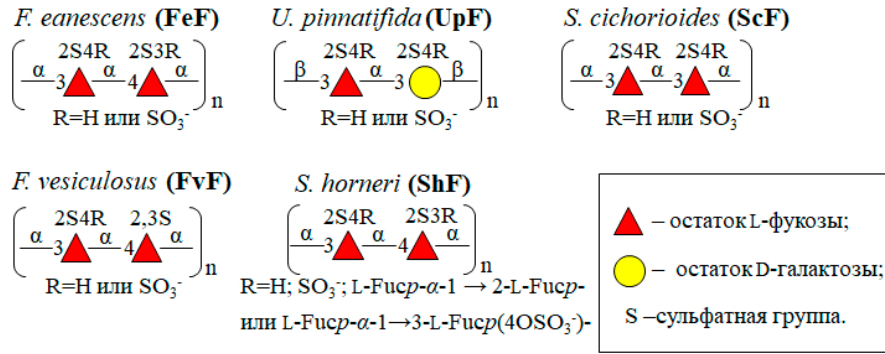
Продолжение таблицы 3

Источник фукоидана (вид бурой водоросли)	Название фракции фукоидана	-SO ₃ Na, %*	Моносахаридный состав, моль%						
			L-Fuc	L-Rha	D-Gal	D-Glc	D-Man	D-Xyl	UA
<i>U. pinnatifida</i>	UpF	23	64,8	0,0	35,2	0,0	0,0	0,0	0,0

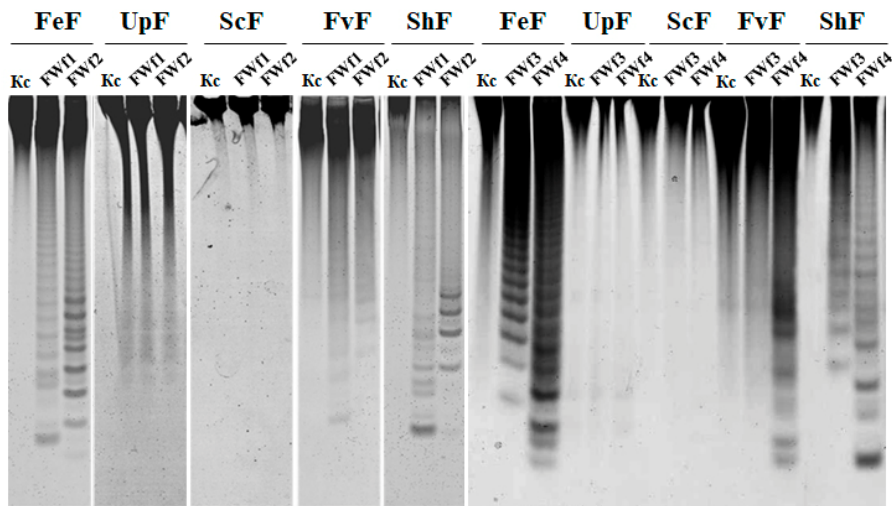
Примечание: * – % от массы образца

Для оценки активности фукоидаз FWf1–4 по отношению к фукоидам был использован ПААГ-электрофорез (Рисунок 21, Б). Показано, что все рекомбинантные фукоидазы FWf1–4 катализировали гидролиз фукоиданов, выделенных из бурых водорослей *F. evanescens* (FeF) и *S. horneri* (ShF), состоящих в основном из чередующихся 1→3-;1→4-связанных остатков α-L-фукозы, но различающихся схемами сульфатирования [51, 87, 173, 174] (Рисунок 21, А). Полосы олигосахаридов – продуктов гидролиза на электрофореграмме отличались интенсивностью окрашивания, что указывает на различную эффективность деполимеризации фукоиданов фукоидазами (Рисунок 21, Б и В). Исследуемые фукоидазы не катализировали гидролиз фукоидана из *S. cichorioides* (ScF) [175] в котором остатки сульфатированной α-L-фукозы соединены 1→3-гликозидными связями, а также галактофукана, выделенного из *U. pinnatifida* (UpF) [97] (Рисунок 21). Полученные данные указывают на то, что все исследуемые ферменты специфичны к гидролизу α-1→4-гликозидных связей между сульфатированными остатками α-L-фукозы. Интересно, что коммерческий фукоидан, выделенный из *F. vesiculosus* (FvF), который, как было показано ранее, имеет основную цепь схожую с FeF и ShF [88], расщеплялся FWf1, FWf2 и FWf4, но не FWf3 (Рисунок 21). Вероятно, различия в расположении некоторых заместителей при остатках α-L-фукозы (сульфатной, ацетатной группы или наличия/отсутствия разветвления) в фукоиданах может влиять на способность эндо-фукоидаз катализировать гидролиз гликозидных связей. Подобные наблюдения были отмечены при изучении фукоидаз семейства GH107, FFA1 и FFA2 из *F. algae* и FcnA из *M. fucanivorans* [46, 52, 87, 128]. Эти фукоидазы катализируют гидролиз 1→4-гликозидных связей между сульфатированными остатками α-L-фукозы, но расположение сульфатных групп при остатках α-L-фукозы в местах расщепления отличается. Таким образом, накопленные на сегодняшний день данные указывают на то, что фукоидазы семейства GH107 потенциально могут отличаться специфичностью не только по отношению к гидролизу определенного типа гликозидной связи между остатками сульфатированной α-L-фукозы, но и к расположению сульфатных групп при этих остатках.

А.



Б.



В.

Субстрат (фукоидан)	Тип гликозидных связей	Уровень фукоиданазной активности			
		FWf1	FWf2	FWf3	FWf4
FeF	(1→3;1→4)	++	+++	++	+++
UpF	(1→3)	-	-	-	-
ScF	(1→3)	-	-	-	-
FvF	(1→3;1→4)	+	+	-	++
ShF	(1→3;1→4)	++	++	+	++

Рисунок 21 – Анализ активности фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоиданам, выделенным из различных видов бурых водорослей. (А) Схема основных структурных мотивов, присутствующих в фукоиданах, выделенных из *F. evanescens* (FeF), *U. pinnatifida* (UpF), *S. cichorioides* (ScF), *F. vesiculosus* (FvF) и *S. horneri* (ShF). Б) Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоиданов FeF, UpF, ScF, FvF или ShF, полученных с помощью FWf1–4. (В) Таблица, демонстрирующая уровень активности FWf1–4 по отношению к FeF, UpF, ScF, FvF или ShF: (–) – активность фукоиданазы не обнаружена; (+) – низкая активность; (++) – средняя активность; (+++) – высокая активность. Данные были получены из электрофореграммы (Б). Кс – фукоиданы FeF, UpF, ScF, FvF или ShF, не подвергавшиеся ферментативному гидролизу

2.5.2 Совместное действие фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоидану, выделенному из бурой водоросли *F. evanescens*

Из электрофореграмм видно, что ни один из исследуемых ферментов, FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4, не способен расщеплять фукоиданы ShF, FeF и FvF полностью (Рисунок 21). Во всех случаях при ферментативном гидролизе, помимо сульфатированных олигосахаридов, образуется фракция с большей молекулярной массой, которая не поддается дальнейшему расщеплению ферментом. Схожая закономерность наблюдалась при изучении некоторых фукоиданаз семейства GH107 [51, 52, 176], это свидетельствует об ограниченности действия этих ферментов обусловленной, вероятно, их строгой специфичностью.

Было оценено совместное действие фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоидану FeF. Показано, что одновременная обработка фукоидана FeF всеми исследуемыми фукоиданазми приводила к его более глубокой деполимеризации, чем при обработке каждым из ферментов по-отдельности (Рисунок 22). Полученные данные также указывают на то, что наличие сразу четырех генов фукоиданаз в фукоидандеградирующем кластере *W. fucanilytica* CZ1127 не является избыточным. Очевидно, что такое разнообразие фукоиданаз необходимо бактерии для более эффективной деградации фукоиданов, имеющих сложное структурное строение.

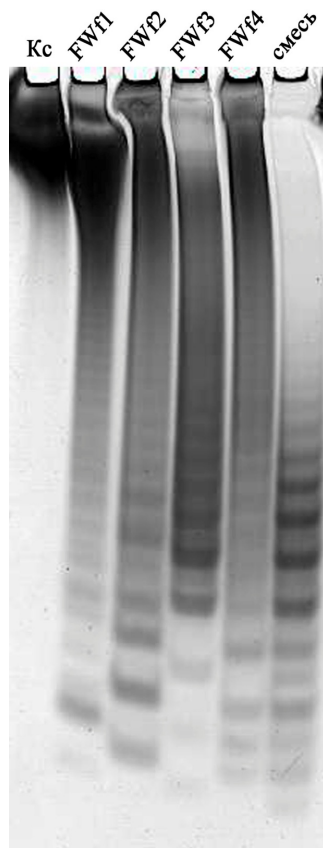


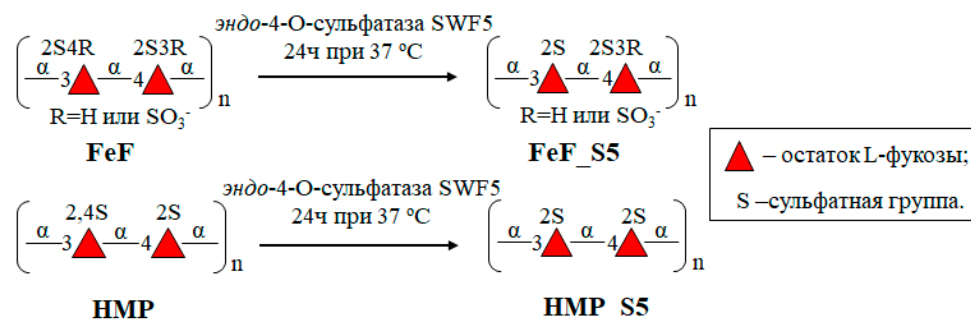
Рисунок 22 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана FeF, полученных с помощью FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 и при их совместном действии. Kc – фукоиданы FeF, UpF, ScF, FvF или ShF, не подвергавшиеся ферментативному гидролизу

2.5.3 Ферментативный гидролиз 4-О-десульфатированных фукоиданов с помощью рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4

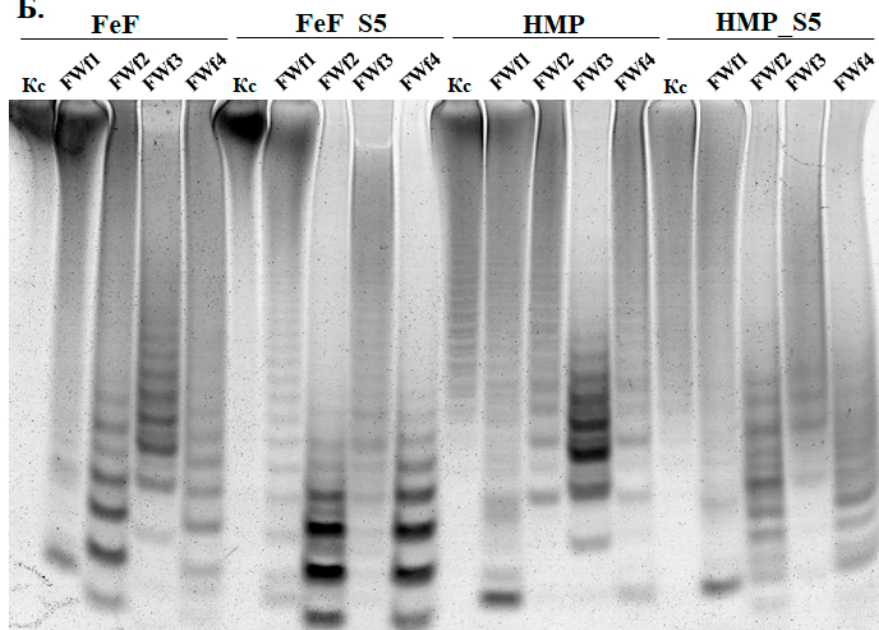
Предыдущие эксперименты показали, что фукоиданазы расщепляют гликозидные связи внутри различных структурных фрагментов, присутствующих в фукоиданах. Так, можно предположить, что основным различием может являться распознавание ферментами различного сульфатирования в фукоиданах. Определение специфичности фукоиданаз к определенным схемам сульфатирования в фукоиданах является достаточно сложной задачей. Недавнее открытие фукоидансульфатаз дает возможность манипулировать схемами сульфатирования фукоиданов [177], что можно использовать для получения набора производных фукоиданов с определенным сульфатированием.

Фукоидан FeF и его высокомолекулярное производное НМР, полученное с помощью эндо-фукоиданазы FFA2 [52], были селективно 4-О-десульфированы с помощью эндо-4-О-сульфатазы SWF5 (Рисунок 23, А). Ранее было показано, что FeF и НМР содержат значительное количество сульфатных групп в положениях С4 при остатках α -L-фукозы. После обработки FeF и НМР сульфатазой SWF5 полученные производные, FeF_S5 и НМР_S5, имели преимущественно регулярную 2-О-сульфатированную структуру: $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow]_n$. Фукоидан FeF, НМР, а также их 4-О-десульфатированные производные, FeF_S5 и НМР_S5, были использованы в качестве субстратов для анализа эффективности действия фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоиданам с различным сульфатированием. Активность исследуемых фукоиданаз по отношению к фукоиданам FeF и НМР и их 4-О-десульфатированным производным FeF_S5 и НМР_S5 значительно отличалась (Рисунок 23, Б). Фукоиданазы FWf1 и FWf3 продемонстрировали снижение активности по отношению к производным НМР_S5 и FeF_S5 по сравнению с исходными НМР и FeF. В отличие от них, фукоиданазы FWf2 и FWf4 эффективнее деполимеризовали FeF_S5 и НМР_S5, по сравнению с НМР и FeF (Рисунок 23, Б и В). Полученные данные указывают на различия в специфичности исследуемых ферментов по отношению к 4-О-сульфатированию в фукоиданах. Вероятно, для гидролиза гликозидных связей в фукоиданах FWf1 и FWf3 необходимо наличие 2,4-ди-О-сульфатирования, а регулярные 2-О-сульфатированные фрагменты устойчивы к их действию. Фукоиданазы FWf2 и FWf4, напротив, проявляют специфичность к фукоиданам или их фрагментам, схема сульфатирования которых не подразумевает наличия сульфатных групп в положениях С4.

А.



Б.



В.

Субстрат (фукоидан)	Модификация субстрата	Уровень фукоиданазной активности			
		FWf1	FWf2	FWf3	FWf4
FeF	нет	++	++	++	++
FeF_S5	4-О-десульфатирование	+	+++	+	+++
HMP	нет	+++	+	+++	+
HMP_S5	4-О-десульфатирование	++	++	+	++

Рисунок 23 – Анализ активности фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоиданам FeF, HMP и их 4-О-десульфатированным производным FeF_S5 и HMP_S5. (А) Схема получения 4-О-десульфатированных производных FeF_S5 и HMP_S5 из FeF и HMP с использованием эндо-4-О-сульфатазы SWF5. (Б) Электрофореграмма продуктов гидролиза FeF, HMP и их 4-О-десульфатированных производных FeF_S5 и HMP_S5, полученных с помощью FWf1–4. (В) Таблица, демонстрирующая уровень активности FWf1–4 по отношению к FeF, HMP, FeF_S5 и HMP_S5: (–) активность фукоиданазы не обнаружена; (+) низкая активность; (++) средняя активность; (+++) высокая активность. Данные были получены на основании электрофореграммы (Б). Kc – фукоиданы FeF и HMP или их производные FeF_S5 и HMP_S5 без добавления фукоиданаз

2.5.4 Получение продуктов ферментативного гидролиза фукоидана из *F. evanescens* и установление их строения с помощью ЯМР-спектроскопии

Исследование структур продуктов ферментативного гидролиза субстрата, как правило, позволяет получить подробную информацию о специфичности ферментов. С этой целью, а также для изучения структуры фукоидана из *F. evanescens* (FeF) и получения сульфатированных олигосахаридов были получены продукты ферментативного действия фукоиданаз FWf1-4 по отношению к фукоидану FeF (Рисунок 24). Продукты деполимеризации FeF были дополнительно разделены на высоко- (ВМП) и низкомолекулярные (НМП) продукты реакции с помощью осаждения высокомолекулярных фрагментов 75%-ным водным этанолом. Выходы ВМП и НМП составляли 44% (220 мг) и 49% (245 мг) для FWf1, 51% (255 мг) и 43% (215 мг) для FWf2, 57% (285 мг) и 26% (130 мг) для FWf3 и 46% (230 мг) и 43% (215 мг) для FWf4 соответственно.

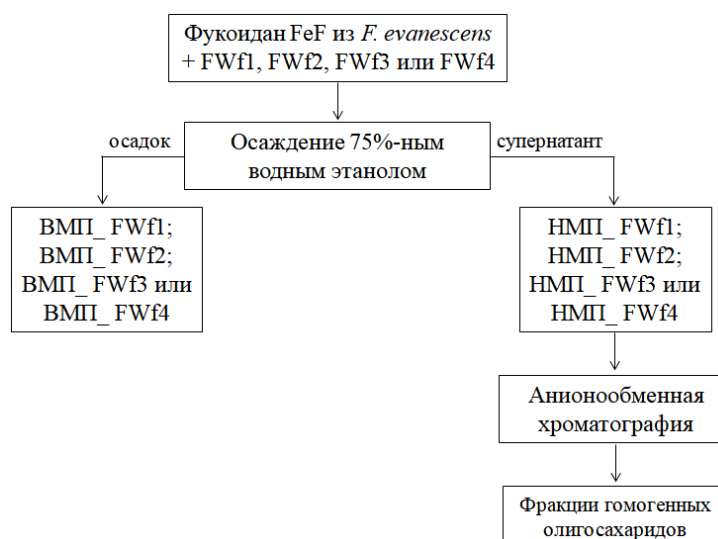


Рисунок 24 – Схема получения продуктов ферментативной деполимеризации фукоидана FeF с помощью фукоиданаз FWf1–4

Согласно данным, полученным с помощью ВЭЖХ, средняя молекулярная масса фукоидана FeF и полученных высокомолекулярных производных, ВМП_FWf3 и ВМП_FWf4, составила около 356 кДа, 73 кДа и 69 кДа соответственно. Производные ВМП_FWf1 и ВМП_FWf2 имели полидисперсный состав, распределение молекулярных масс составило от 6 до 187 кДа для ВМП_FWf1 и от 5,5 до 210 кДа для ВМП_FWf2 (Рисунок 25, А).

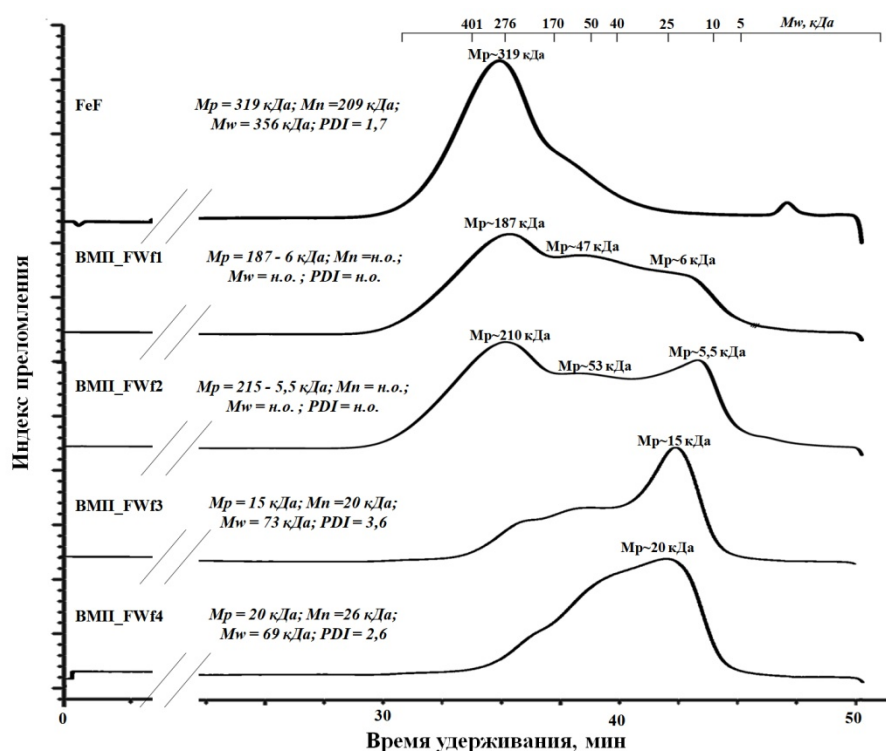


Рисунок 25 – Анализ фукоидана FeF и его ферментативных производных ВМП_FWf1–4 с помощью гельпроникающей хроматографии на последовательно соединенных колонках ShodexOHpak SB-805 HQ и OHpak SB-803 HQ. Параметры M_r , M_n , M_w и PDI образцов фукоидана рассчитывали с использованием декстранов в качестве стандартов. M_w – молекулярная масса; M_n – среднечисловая молекулярная масса; M_r – молекулярная масса, соответствующая максимуму хроматографического пика; PDI – индекс полидисперсности

Анализ состава сульфатированных олигосахаридов в полученных фракциях НМП_FWf1, НМП_FWf2, НМП_FWf3 и НМП_FWf4 (далее НМП_FWf1–4) с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения ИЭР-МС¹ не привел к удовлетворительным результатам (Приложение 4). Наблюдались множественные сигналы, указывающие на разрушение олигосахаридов в источнике. Существующие методы масс-спектрометрии разрабатывались для работы с белковыми соединениями, и, вероятно, существуют физические ограничения данного метода для веществ углеводной природы с высокой плотностью заряда: в источнике ионов происходит частичное разрушения углеводного скелета исследуемых веществ, а также отщепление сульфатных групп. Схожие наблюдения были сделаны ранее при изучении структур сульфатированных фукоолигосахаридов, продуцируемых фукоиданазой из морского моллюска *Lambis* sp., с помощью MALDI TOF масс-спектрометрии [40]. Тем не менее, в случае фракций НМП_FWf2 и НМП_FWf4 удалось зарегистрировать ионы, соответствующие углеводным цепям до 11 остатков фукозы и до 5 сульфатных групп на молекулу.

¹ Запись и анализ масс-спектров были проведены сотрудником лаборатории физико-химических методов исследования, к.х.н. Анастюком С.Д.

Был проведен анализ фракций НМП_FWf1–4 с помощью гелипроникающей хроматографии с рефрактометрической детекцией. В качестве стандартов для оценки степени полимеризации (СП) олигосахаридов, входящих в состав фракций НМП, были использованы 2-О-сульфатированные фукоолигосахариды различной степени полимеризации (Рисунок 26, А). Рассчитанное распределение степеней полимеризации для олигосахаридов составило СП~2–10 (СП основного компонента ~5, Mw~1360 Да) для НМП_FWf1, СП~7–11 (СП основного компонента ~10, Mw~2400 Да) для НМП_FWf2 и СП~7–11 (СП основного компонента ~10, Mw~2570 Да) для НМП_FWf3, СП~5–10 (СП основного компонента ~9, Mw~2300 Да) для НМП_FWf4 (Рисунок 26, А и Б). Расчетные значения СП могут значительно отличаться от реальных, так как олигосахариды в низкомолекулярных фракциях могут иметь отличную от использованных для анализа стандартов схему сульфатирования. Степень сульфатирования и моносахаридный состав полученных производных представлен в Таблице 4.

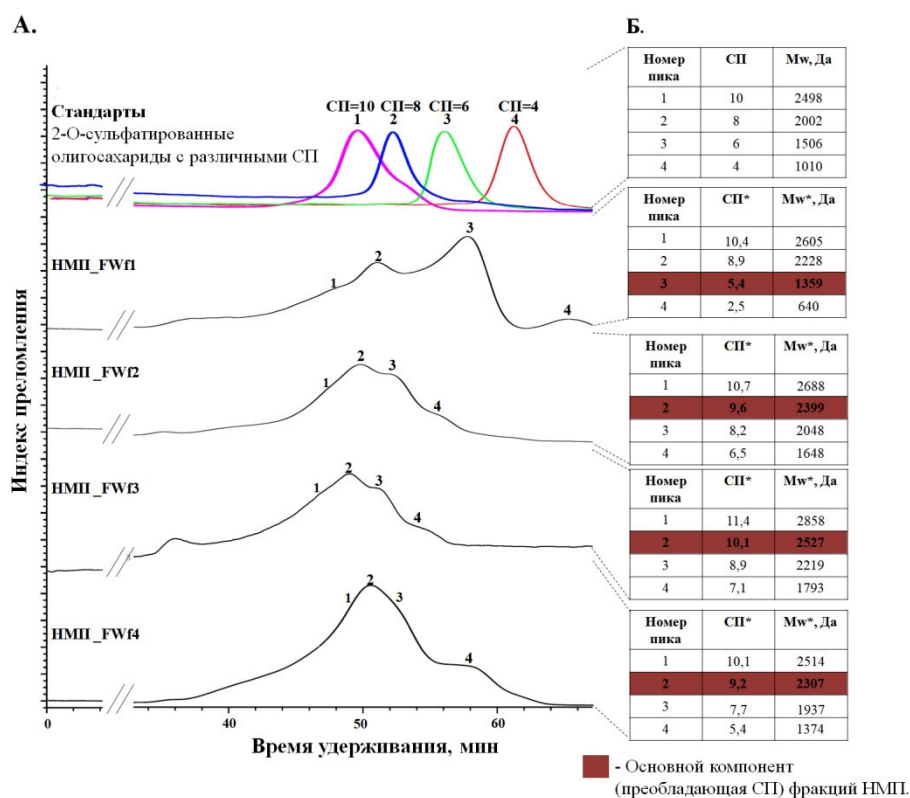


Рисунок 26 – (А) Анализ фракций НМП_FWf1–4 с помощью гелипроникающей хроматографии на колонке Superdex 30. Степень полимеризации (СП) основных олигосахаридов во фракциях НМП_FWf1–4, рассчитанная с помощью 2-О-сульфатированных фукоолигосахаридов 4F2S(4S), 6F2S(6S), 8F2S(8S) и 10F2S(10S) в качестве стандартов. Рассчитанные значения СП и Mw основных пиков (плечей пиков) олигосахаридов во фракциях НМП_FWf1–4 приведены в таблицах (Б). (*) - Приведенные значения СП и Mw могут отличаться от истинных значений СП олигосахаридов, присутствующих в исследуемых фракциях НМП, поскольку структуры этих олигосахаридов могут отличаться от используемых 2-О-сульфатированных стандартов. Mw – молекулярная масса; Mn – среднечисловая молекулярная масса; Mr – молекулярная масса, соответствующая максимуму хроматографического пика; PDI – индекс полидисперсности

Таблица 4 – Структурные характеристики ВМП и НМП фракций, полученных в результате гидролиза фукоидана FeF фукоиданазами FWf1–4

Название фракции	-SO ₃ Na, %*	Моносахаридный состав, моль%						
		L-Fuc	L-Rha	D-Gal	D-Glc	D-Man	D-Xyl	UA
FeF	26	95,7	1,4	1,7	0,6	0,6	0	0
ВМП_FWf1	25	93,1	2,1	3,1	0,8	0,9	93,1	2,1
ВМП_FWf2	25	91,0	2,4	4,0	1,1	1,5	91,0	2,4
ВМП_FWf3	23	92,7	1,9	2,9	0,9	1,5	0,0	0,0
ВМП_FWf4	31	92,3	2,5	3,3	0,8	1,2	0,0	0,0
НМП_FWf1	26	95,2	0,3	0,1	0,0	4,3	0,0	0,0
НМП_FWf2	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
НМП_FWf3	30	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
НМП_FWf4	28	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: * – % от массы образца

Информация о структурах фракций ВМП_FWf1, ВМП_FWf2, ВМП_FWf3 и ВМП_FWf4 (далее ВМП_FWf1–4) была получена с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР)². Было обнаружено, что ВМП_FWf1 и ВМП_FWf2 имели схожие структуры, основными фрагментами которых являлись две несвязанные полисахаридные цепи: [→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→]_n и [→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-α-1→]_n. Фракция ВМП_FWf3 состояла преимущественно из 2-О-сульфатированного полисахарида со следующей структурой: [→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→]_n. Доминирующий структурный мотив фракции ВМП_FWf4 представлял собой регулярный фрагмент [→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-α-1→]_n (таблицы соотношения сигналов протонов см. в Приложении 5).

Разделение сульфатированных олигосахаридов, входящих в состав фракций НМП_FWf1–4, проводили с помощью анионообменной хроматографии низкого давления. Для выделения гомогенных олигосахаридов были подобраны оптимальные схемы градиентов концентраций NH₄HCO₃ и/или NaCl. Наличие сахаров в полученных фракциях определяли с помощью фенол-серноокислотного метода (Рисунок 27, А, В и Д; Рисунок 28, А, В и Д и Рисунок 29, А, В и Д). Каждую из полученных фракций подвергали дополнительному анализу с помощью ПААГ-электрофореза для выявления фракций содержащих гомогенные олигосахариды (Рисунок 27, Б, Г и Е; Рисунок 28, Б, Г и Е и Рисунок 29, Б, Г и Е).

² Запись и анализ спектров ЯМР были проведены сотрудником лаборатории химии ферментов ТИБОУ ДВО РАН, к.х.н. Расиным А.Б. и сотрудником лаборатории физико-химических методов, д.х.н. Калиновским А.И.

В результате разделения НМП_FWf1 (Рисунок 27, А и Б) было получено два гомогенных олигосахарида, FWf1-Фр1 и FWf1-Фр2, с выходами 0,60% (3 мг) и 0,78% (3,9 мг) соответственно. Из смеси НМП_FWf2 были выделены три гомогенных олигосахарида, FWf2-Фр1, FWf2-Фр2 и FWf2-Фр3 (Рисунок 27, В и Г), с выходами 1,14% (5,7 мг), 0,92% (4,6 мг) и 1,58% (7,9 мг) FWf2-Фр3 соответственно.

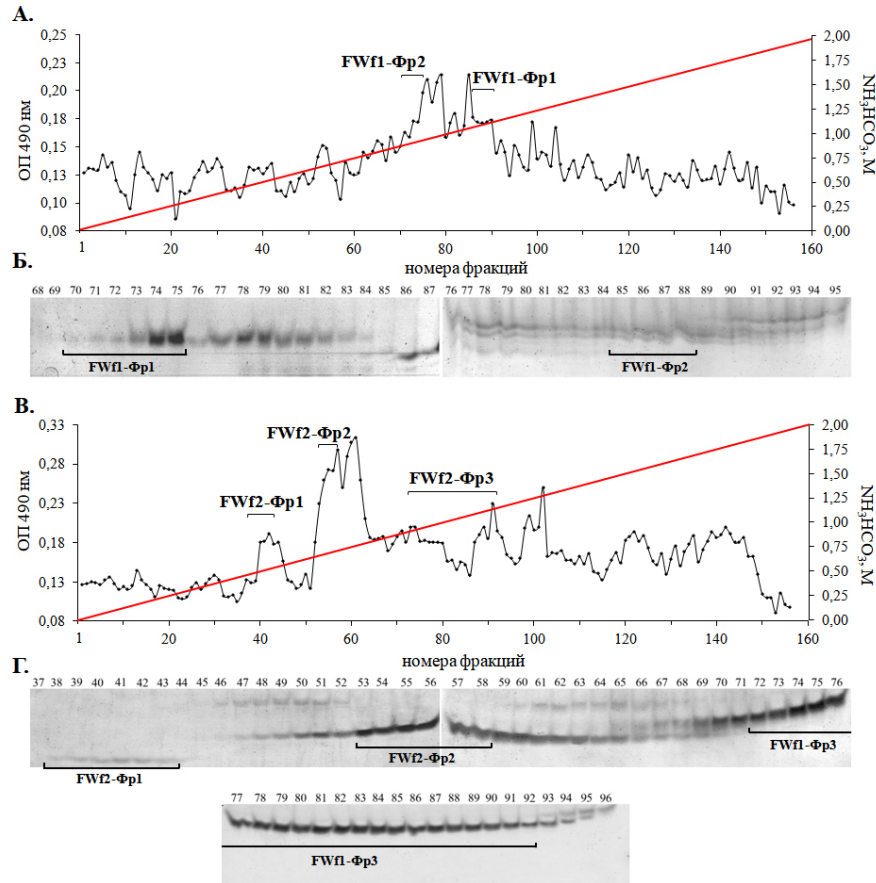


Рисунок 27 – Профили элюирования НМП_FWf1 (А) и НМП_FWf2 (В) с колонки с анионообменным носителем Q-Sepharose HP и электрофореграммы фракций, содержащих сульфатированные олигосахариды, полученные в результате действия фукоиданаз FWf1 (Б) и FWf2 (Г). Скобки обозначают фракции, содержащие преимущественно гомогенные олигосахариды, которые были объединены в отдельные фракции FWf1-Фр1, FWf1-Фр2, FWf2-Фр1, FWf2-Фр2 и FWf2-Фр3

Пять фукоолигосахаридов было получено при разделении НМП_FWf3 (Рисунок 28, А и Б): FWf3-Фр1 (0,20%, 1 мг), FWf3-Фр2 (0,98%, 4,9 мг), FWf3-Фр3 (1,02%, 5,1 мг), FWf3-Фр4 (1,18%, 5,9 мг) и FWf3-Фр5 (1,4%, 7 мг). Примечательно, что продукты деполимеризации FeF, полученные при действии FWf3, элюировались преимущественно градиентом концентрации NaCl, но не NH₄HCO₃ (Рисунок 28, А). Это может указывать на более высокую степень сульфатирования данных фукоолигосахаридов, по сравнению с олигосахаридами, полученными под действием FWf1, FWf2 или FWf4. В результате разделения НМП_FWf4 (Рисунок 29) также были получены пять фракций гомогенных олигосахаридов: FWf4-Фр1 (0,40%, 2 мг), FWf4-Фр2 (1,20%, 6 мг), FWf4-Фр3 (1,06%, 5,3 мг), FWf4-Фр4 (1,04%, 5,2 мг) и FWf4-Фр5 (0,60%, 3 мг).

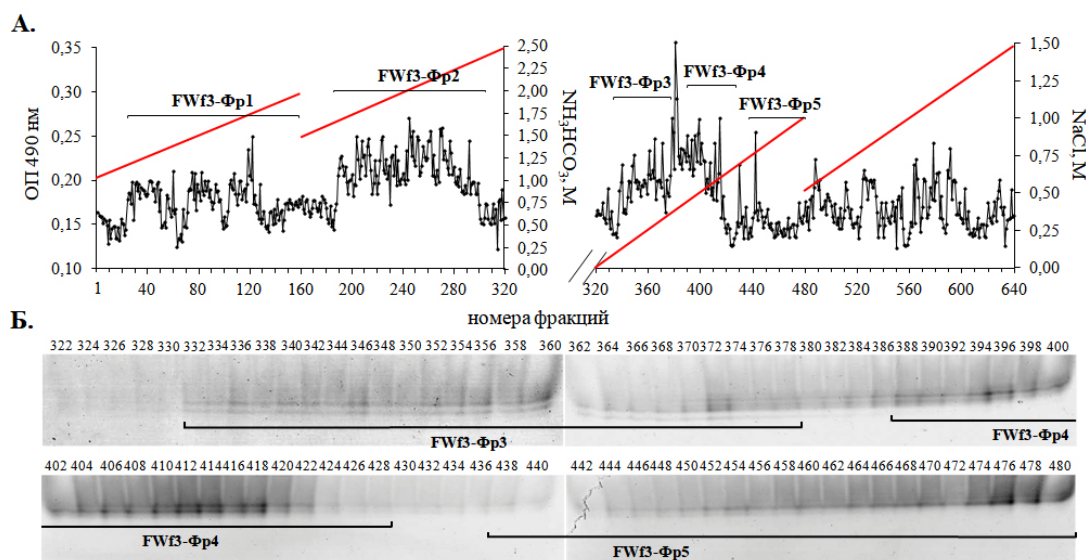


Рисунок 28 – (А) Профили элюирования НМП_FWf3 с колонки с анионообменным носителем Q-Sepharose HP. (Б) Электрофореграммы фракций, содержащих сульфатированные олигосахариды. Скобки обозначают фракции, содержащие преимущественно гомогенные олигосахариды, которые были объединены в отдельные фракции FWf3-Фр1, FWf3-Фр2, FWf3-Фр3, FWf3-Фр4 и FWf3-Фр5. Электрофореграммы фракций FWf3-Фр1 и FWf3-Фр2 не приведены, поскольку их детектирование с помощью ПААГ-электрофореза было затруднено из-за низкого содержания олигосахаридов

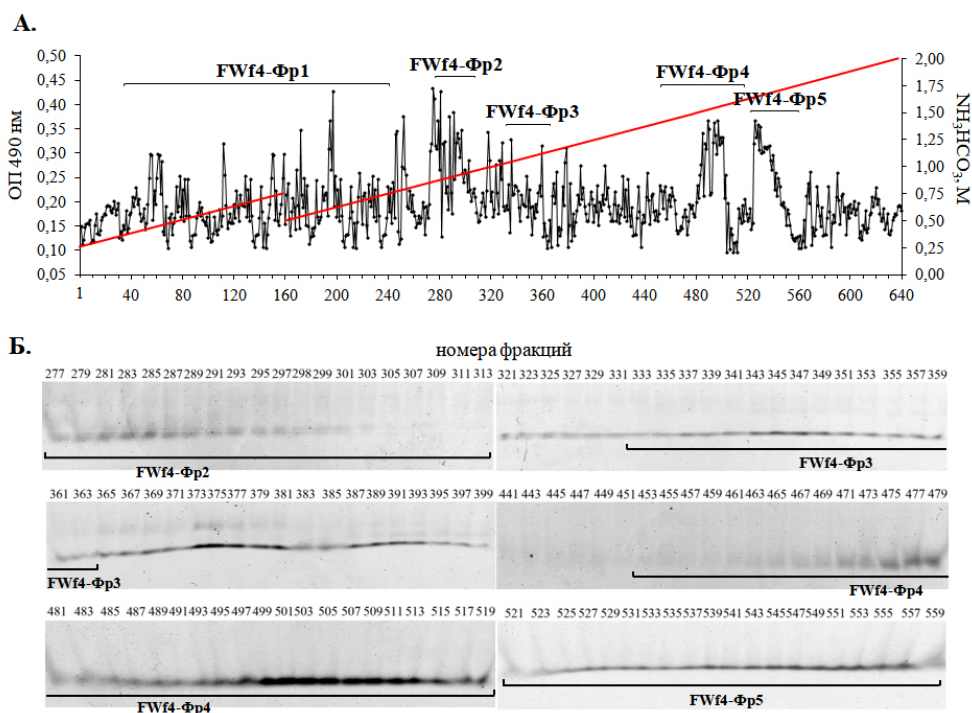


Рисунок 29 – Профили элюирования НМП_FWf4 (А) с колонки с анионообменным носителем Q-Sepharose HP и электрофореграммы фракций, содержащих сульфатированные олигосахариды (Б). Скобки обозначают фракции, содержащие преимущественно гомогенные олигосахариды, которые были объединены в отдельные фракции FWf4-Фр1, FWf4-Фр2, FWf4-Фр3, FWf4-Фр4 и FWf4-Фр5. Электрофореграмма фракции FWf4-Фр1 не приведена, поскольку ее детектирование с помощью ПААГ-электрофореза было затруднено из-за низкого содержания олигосахаридов

Гомогенность всех полученных олигосахаридов была подтверждена с помощью ПААГ-электрофореза (Рисунок 30, А). Структуры выделенных олигосахаридов были изучены с помощью ЯМР-спектроскопии с использованием одно- и двумерных методик (^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HSQC, HMBC)³ (таблицы соотнесения сигналов протонов см. в Приложении 5). Структуры олигосахаридов или их фрагментов, которые удалось установить с помощью ЯМР-спектроскопии, изображены на Рисунке 30 (Б, В, Г, Д). Установлено, что все олигосахариды, полученные с помощью фукоиданаз FWf1-4, имеют схожие последовательности гликозидных связей (1→3-;1→4-;1→3-) между остатками α -L-фукозы, однако имеют различия в расположении сульфатных групп. Так, олигосахариды, полученные под действием FWf1 и FWf4, имеют смешанное 2-О-, 2,3-ди-О- и/или 2,4-ди-О-сульфатирование, в то время как олигосахариды, полученные под действием FWf2, имеют регулярное 2-О-сульфатирование.

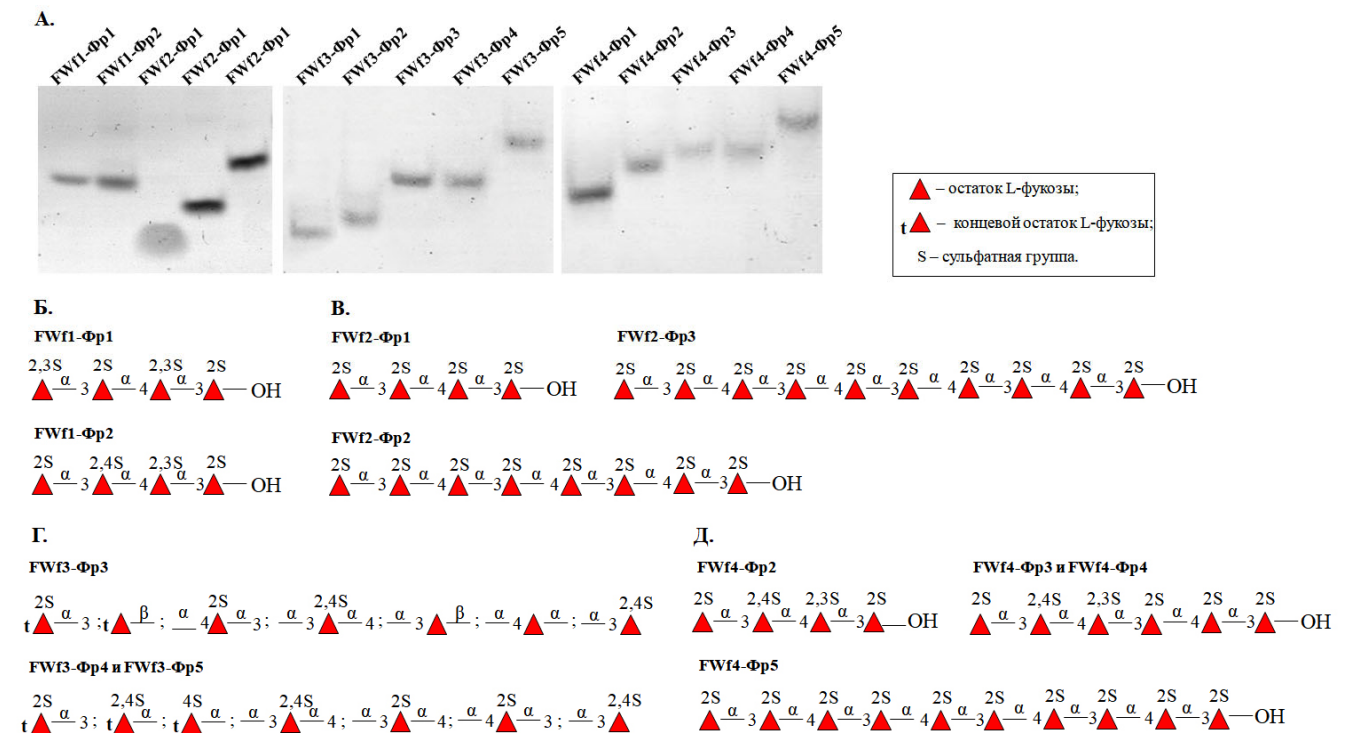


Рисунок 30 – Электрофореграмма (А) и схематическое изображение структур выделенных олигосахаридов – продуктов ферментативного гидролиза фукоидана FeF, полученных с помощью фукоиданаз FWf1 (Б), FWf2 (В), FWf3 (Г) и FWf4 (Д)

Олигосахариды, выделенные из НМП_ FWf3, имели более сложную структуру и, вероятно, большое количество изомеров, что затрудняло получение исчерпывающей информации об их строении. Анализ полученных спектров ЯМР выявил основные структурные

³ Запись и анализ спектров ЯМР были проведены сотрудником лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Расиным А.Б. и сотрудником лаборатории физико-химических методов, д.х.н. Калиновским А.И.

фрагменты, входящие в состав олигосахаридов FWf3-Фр3, FWf3-Фр4 и FWf3-Фр5, но не их последовательность. Согласно полученным данным, FWf3-Фр3 содержит как сульфатированные так и несulfатированные остатки L-фукозы: L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-, L-Fucp-β-(1→, α-1→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-, -α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-α-1→4-, -α-1→3-L-Fucp-β-1→, -α-1→3-L-Fucp-α-1→, -α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻). Подобные остатки обнаружены в FWf3-Фр4 и FWf3-Фр5: L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-, L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-α-1→, L-Fucp(4OSO₃⁻)-α-1→, -α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-α-1→4-, -α-1→3-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→4-, -α-1→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-, -α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻). Интересно отметить, что фракция FWf3-Фр3, по-видимому, содержит остатки L-фукозы, связанные β-гликозидными связями, которые ранее не были детектированы в фукоидане, выделенном из *F. evanescens*, вероятно, из-за их небольшого содержания. Остатки L-фукозы, связанные β-гликозидными связями, ранее были обнаружены в фукоиданах, выделенных из бурых водорослей *Sargassum pallidum* [178] и *S. thunbergii* [179]. Фракции FWf3-Фр4 и FWf3-Фр5 содержат остатки α-L-фукозы с 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатированием, но, в отличие от FWf3-Фр3, несulfатированные остатки α-L-фукозы в их составе не обнаружены (Рисунок 30, Г).

Полученные данные о структуре продуктов гидролиза фукоидана FeF позволяют сделать некоторые выводы о специфичности исследуемых фукоидаз FWf1–4. Так, порядок гликозидных связей 1→3-;1→4-;1→3- в выделенных олигосахаридах указывает на то, что все исследуемые ферменты расщепляют 1→4-гликозидные связи между остатками α-L-фукозы в фукоидане. Анализ расположения сульфатных групп при терминальных остатках α-L-фукозы, расположенных на восстанавливающем (В) и невосстанавливающем (НВ) концах, позволяет сделать вывод о специфичности фукоидаз к расщеплению гликозидных связей между сульфатными группами, расположенными определенным образом. Например, олигосахариды FWf1-Фр1 и FWf1-Фр2 содержат на В конце 2-О-сульфатированные, а на НВ конце 2,3-ди-О-сульфатированные остатки α-L-фукозы. Следовательно, FWf1 расщепляет 1→4-гликозидные связи между 2-О- и 2,3-ди-О-сульфатированными остатками α-L-фукозы. Фукоидаза FWf1 не способна расщеплять гликозидные связи между 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатированными остатками α-L-фукозы. На это указывает формирование резистентной к дальнейшему ферментативному гидролизу фракции ВМП₁_FWf1 со структурой [→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→]_n и [→4-L-Fucp(2OSO₃⁻)-α-1→3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻)-α-1→]_n. В олигосахаридах, полученных под действием FWf3, остатки α-L-фукозы 2-О-сульфатированы на В конце и 2,4-ди-О-сульфатированы на НВ конце. Таким образом, FWf3 расщепляет 1→4-гликозидные связи между 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатированными остатками α-L-фукозы. Структура фракции ВМП₁_FWf3 указывает на то, что участки в фукоидане FeF, содержащие только 2-О-сульфатирование, не расщепляются данным ферментом. Фукоидазы FWf2 и FWf4 имеют

схожую специфичность к 1→4-гликозидным связям между 2-О-сульфатированными остатками α-L-фукозы. Оба фермента, как и FWf1, не способны расщеплять гликозидные связи между 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатированными остатками α-L-фукозы. Однако, несмотря на схожесть, FWf2 и FWf4, вероятно, имеют некоторые различия в специфичности. На это указывает различная структура олигосахаридов и состав фракций ВМП, полученных под их действием.

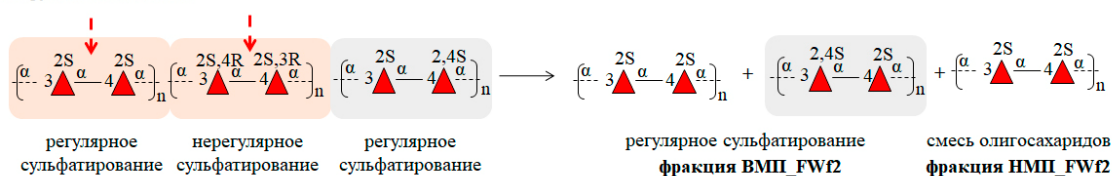
Информация о структуре продуктов ферментативного гидролиза позволяет сделать уточнения по структуре фукоидана FeF из *F. evanescens*. Показано, что фукоиданазы имеют различия в специфичности относительно расположения сульфатных групп. Различная специфичность фукоиданаз к сульфатированию позволила подтвердить ранее сделанное предположение о том, что фукоидан FeF из *F. evanescens* имеет блочное строение. Предположительно, каждый из блоков имеет либо регулярное 2-О-сульфатирование, либо чередующееся 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатирование. Схожую организацию расположения сульфатных групп имеют некоторые гликозаминогликаны млекопитающих.

Как показано, фукоиданазы FWf1–4 имеют различия в специфичности относительно расположения сульфатных групп при остатках α-L-фукозы в фукоиданах. Эта особенность исследуемых ферментов позволяет оценить распределение сульфатных групп вдоль основной цепи этого полисахарида. Полученные данные показывают, что FeF имеет сложную структурную организацию с несколькими областями, содержащими различное сульфатирование. Это подтверждается строением полученных продуктов ферментативного гидролиза. Формирование высокомолекулярных фракций (ВМП) с регулярными структурами $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}1\rightarrow]$ и $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}1\rightarrow]$ при действии исследуемых фукоиданаз указывает на то, что фукоидан FeF содержит протяженные участки с регулярным 2-О-сульфатированием, а также регулярным чередующимся 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатированием (Рисунок 31). Выходы фракций ВМП варьируются от 57 до 44%, таким образом, каждый из таких регулярных участков занимает около половины структуры фукоидана FeF. Низкомолекулярные фракции имеют менее регулярное строение, с разнообразным 2-О-, 2,3-ди-О- и 2,4-ди-О-сульфатированием. Можно предположить, что данные нерегулярные участки являются частью переходной или «транзитной» зоны между участками с регулярным 2-О- и чередующимся 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатированием. Схожая структурная организация описана для гликозаминогликанов млекопитающих, которые содержат протяженные участки с различным сульфатированием [180, 181].

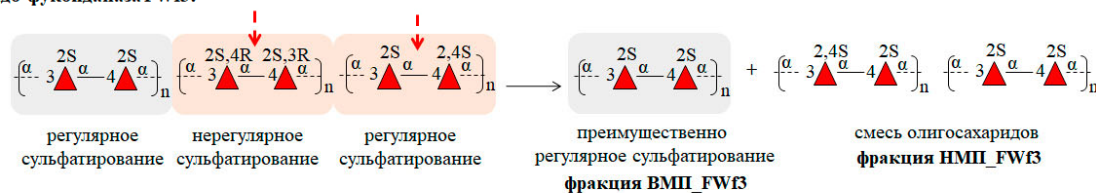
Эндо-фукоиданаза FWf1:



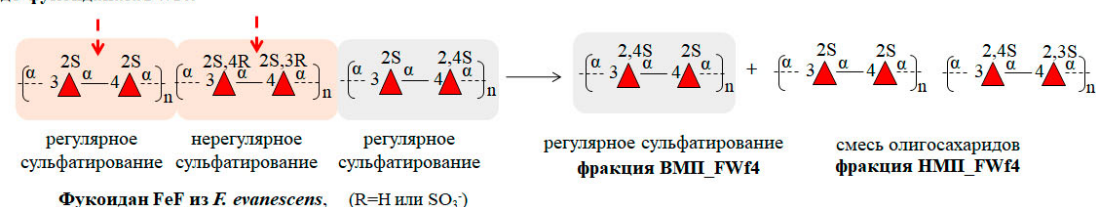
Эндо-фукоиданаза FWf2:



Эндо-фукоиданаза FWf3:



Эндо-фукоиданаза FWf4:



■ - Фрагменты фукоидана расщепляемые эндо-фукоиданазами;

■ - Фрагменты фукоидана устойчивые к действию эндо-фукоиданаз;

Рисунок 31 – Схематическое изображение деполимеризации фукоидана FeF с помощью FWf1–4. Красная стрелка указывает на сайты в FeF, которые фукоиданазы FWf1–4 распознают и расщепляют

2.5.5 Исследование специфичности фукоиданаз с использованием сульфатированных фукоолигосахаридов различной структуры

Олигосахариды различной структуры являются наиболее удобными моделями для изучения детальной специфичности О-гликозидгидролаз. Применение серии различных по структуре олигосахаридов позволяет оценить не только специфичность ферментов к определенному типу гликозидной связи, но и оценить влияние на их специфичность определенного расположения заместителей при углеводных остатках. Отсутствие коммерчески доступных сульфатированных фукоолигосахаридов «тормозит» подобного рода исследования в отношении фукоиданаз.

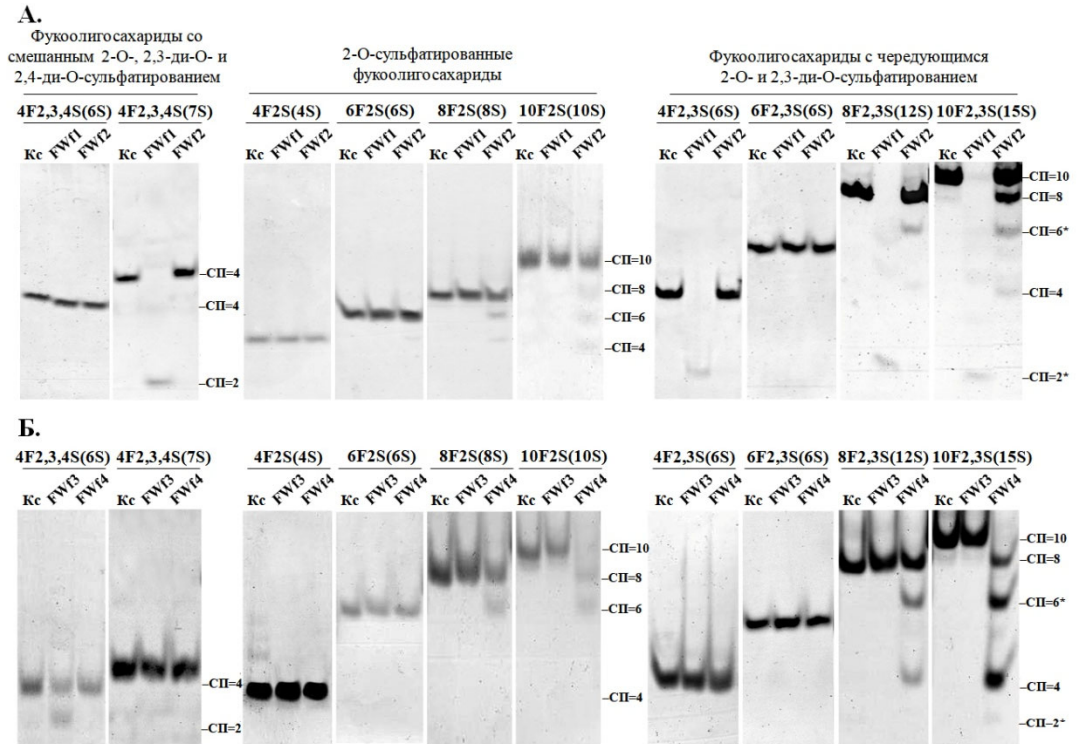
2.5.5.1 Действие фукоиданаз FWf1–4 на сульфатированные фукоолигосахариды различной структуры. Организация углеводсвязывающих подсайтов активного центра фукоиданаз

Известно, что активные центры гликозидгидролаз состоят из тандемных углеводсвязывающих подсайтов, которые распознают и связывают определенные углеводные фрагменты субстрата для его дальнейшего расщепления. Углеводсвязывающие подсайты определяют специфичность гликозидгидролаз. На сегодняшний день организация углеводсвязывающих подсайтов представителей семейства GH107 на экспериментальном уровне не изучена, поскольку для этого требуется наличие большого набора сульфатированных фукоолигосахаридов различной структуры.

Для исследования специфичности FWf1–4 были использованы полученные сульфатированные фукоолигосахариды: 4F2,3,4S(6S) (FWf1-Фр2), 4F2S(4S) (FWf2-Фр1), 8F2S(8S) (FWf2-Фр2), 10F2S(10S) (FWf2-Фр3) (см. раздел 3.6.4). Для увеличения структурного разнообразия сульфатированных фукоолигосахаридов дополнительно были получены фукоолигосахариды 4F2,3,4S(7S), 4F2,3S(6S), 6F2S(6S), 6F2,3S(6S), 8F2,3S(12S), 10F2,3S(15S) по методу, описанному ранее [51]. Все вышперечисленные олигосахариды состояли из остатков α -L-фукозы, связанных чередующимися 1→3-;1→4-гликозидными связями, но отличались степенью полимеризации (СП) и расположением сульфатных групп при остатках α -L-фукозы. Активность FWf1–4 по отношению к сульфатированным олигосахаридам детектировали с помощью ПААГ-электрофореза.

Показано, что активность фукоиданаз FWf1–4 по отношению к полученным сульфатированным фукоолигосахаридам значительно различалась (Рисунок 32) и зависела от определенного расположения сульфатных групп, а также степени полимеризации олигосахаридов. Это может указывать на различия в количестве углеводсвязывающих подсайтов в активных центрах исследуемых ферментов, а также на различия в селективности углеводсвязывающих подсайтов по отношению к определенным схемам сульфатирования.

Фукоиданаз FWf1 не расщепляла 2-О-сульфатированные фукоолигосахариды 4F2S(4S), 6F2S(6S), 8F2S(8S), 10F2S(10S), однако катализировала гидролиз олигосахаридов 4F2,3S(6S), 8F2,3S(12S), 10F2,3S(15S), содержащих дополнительное 3-О-сульфатирование при 1→4-связанных остатках α -L-фукозы (Рисунок 32, А и В). Таким образом, фукоиданаз FWf1 специфична к расщеплению гликозидных связей между остатками 2-О- и 2,3-ди-О-сульфатированной α -L-фукозы и не расщепляет гликозидные связи между 2-О-сульфатированными остатками α -L-фукозы.



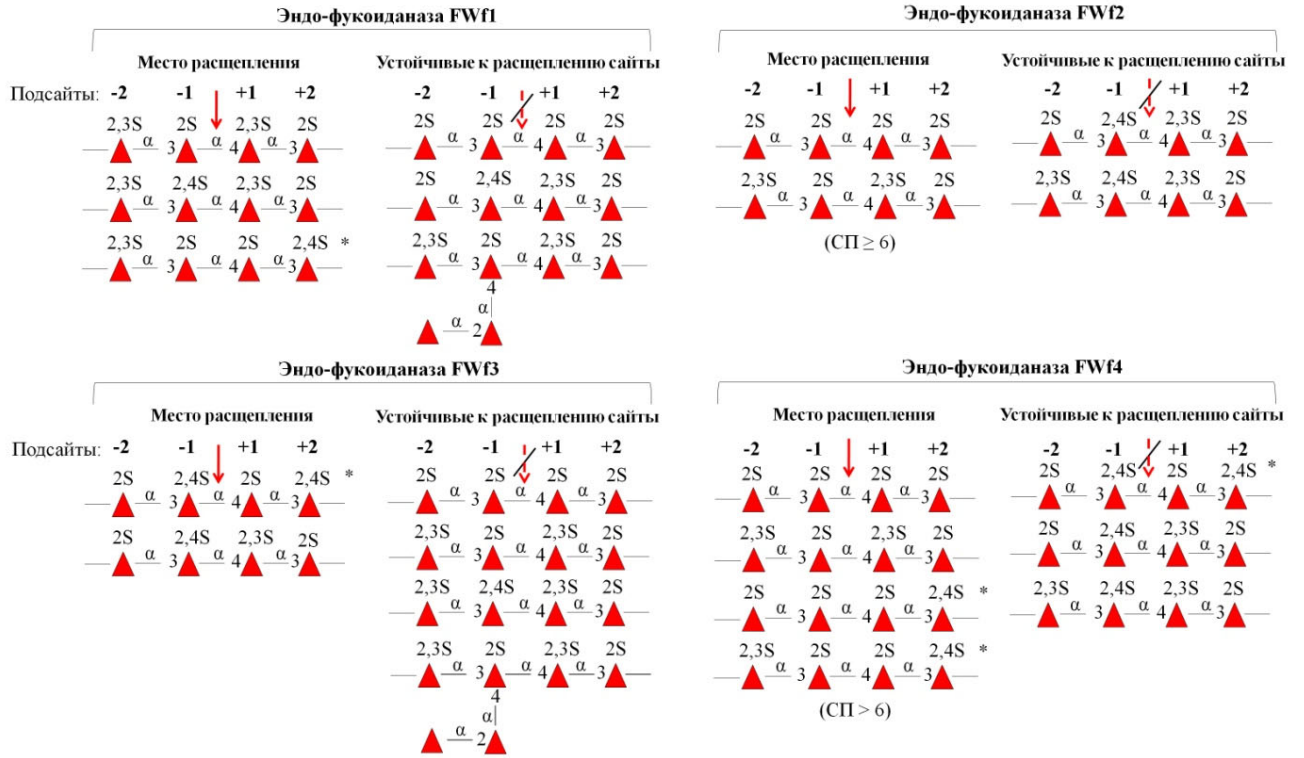
В.

Схематическая структура олигосахаридов	Обозначение	Уровень фукоиданазной активности			
		FWf1	FWf2	FWf3	FWf4
	4F2,3,4S(6S)	-	-	++	-
	4F2,3,4S(7S)	+++	-	-	-
	4F2S(4S)	-	-	-	-
	6F2S(6S)	-	+	-	-
	8F2S(8S)	-	++	-	++
	10F2S(10S)	-	++	-	+++
	4F2,3S(6S)	+++	-	-	-
	6F2,3S(6S)	-	-	-	-
	8F2,3S(12S)	+++	++	-	++
	10F2,3S(15S)	+++	++	-	+++

Рисунок 32 – Анализ активности фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоолигосахаридам. Электрофореграмма продуктов гидролиза, полученных при обработке фукоиданазой FWf1 и FWf2 (А), FWf3 и FWf4 (Б) различных фукоолигосахаридов. (В) Таблица, демонстрирующая уровень активности FWf1–4 по отношению к сульфатированным олигосахаридам: (–) – активность фукоиданазы не обнаружена; (+) – низкая активность; (++) – средняя активность; (+++) – высокая активность. Данные были получены из электрофореграмм (А и Б). (СП = 2*) – рассчитаны исходя из предполагаемых продуктов деполимеризации тетрасахарида 4F2,3,4S(7S) фукоиданазой FWf1 и (СП = 6*) – октасахарид 8F2,3S(12S) фукоиданазой FWf2. Кс – фукоолигосахариды, не подвергавшиеся ферментативному гидролизу

Способность FWf1 катализировать гидролиз тетрасахарида 4F2,3S(6S) с образованием дисахаридов указывает на то, что в активном центре данного фермента содержится, по меньшей мере, четыре углеводсвязывающих подсайта, пронумерованных согласно номенклатуре [26], от -2 до +2, а минимальная СП субстрата, необходимая для его расщепления, равна 4 (Рисунок 33). Данная топология углеводсвязывающих подсайтов FWf1 также подтверждается характером расщепления олигосахаридов с большей СП. Во всех случаях конечными продуктами реакции являются дисахариды. Анализ действия FWf1 на различные олигосахариды позволил сделать вывод, что углеводсвязывающие подсайты в FWf1 не являются равноценными и способны распознавать остатки α -L-фукозы с определенным сульфатированием. Исходя из структуры расщепленного тетрасахарида 4F2,3S(6S) подсайты -2 и +1 распознают 2,3-ди-О-сульфатированные остатки α -L-фукозы, а подсайты -1 и +2 2-О-сульфатированные остатки α -L-фукозы. Способность FWf1 расщеплять тетрасахарид 4F2,3,4S(7S), содержащий дополнительное 4-О-сульфатирование, указывает на способность FWf1 связывать в -1 подсайте помимо 2-О-сульфатированных еще и 2,4-ди-О-сульфатированные остатки α -L-фукозы. Подсайт -2 в FWf1, вероятно, играет наиболее важную роль в распознавании субстрата этим ферментом. Так, тетрасахарид 4F2,3,4S(6S) со смешанным типом сульфатирования был устойчив к действию FWf1, в то время как тетрасахарид 4F2,3,4S(7S) схожей структуры, но имеющий одну дополнительную сульфатную группу в положении С3 терминального остатка α -L-фукозы, эффективно расщеплялся фукоиданазой FWf1. Таким образом, для правильного размещения субстрата в активном центре FWf1 требуется наличие 2,3-ди-О-сульфатированного остатка α -L-фукозы в -2 подсайте (Рисунок 33). FWf1 не катализирует расщепление разветвленного олигосахаридов 6F2,3S(6S), следовательно, наличие боковых ответвлений в -1 подсайте FWf1 ограничивает действие фермента. Исходя из полученных данных, углеводсвязывающие подсайты FWf1 способны распознавать следующие структурные фрагменты фукоиданов: $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ и $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ (Рисунок 33). Предположительно, фрагмент структуры фукоидана $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ так же хорошо распознается FWf1, на что указывает структура тетрасахарида 4F2,3,4S(6S), образующегося в результате гидролиза FeF с помощью FWf1.

А.



Б.

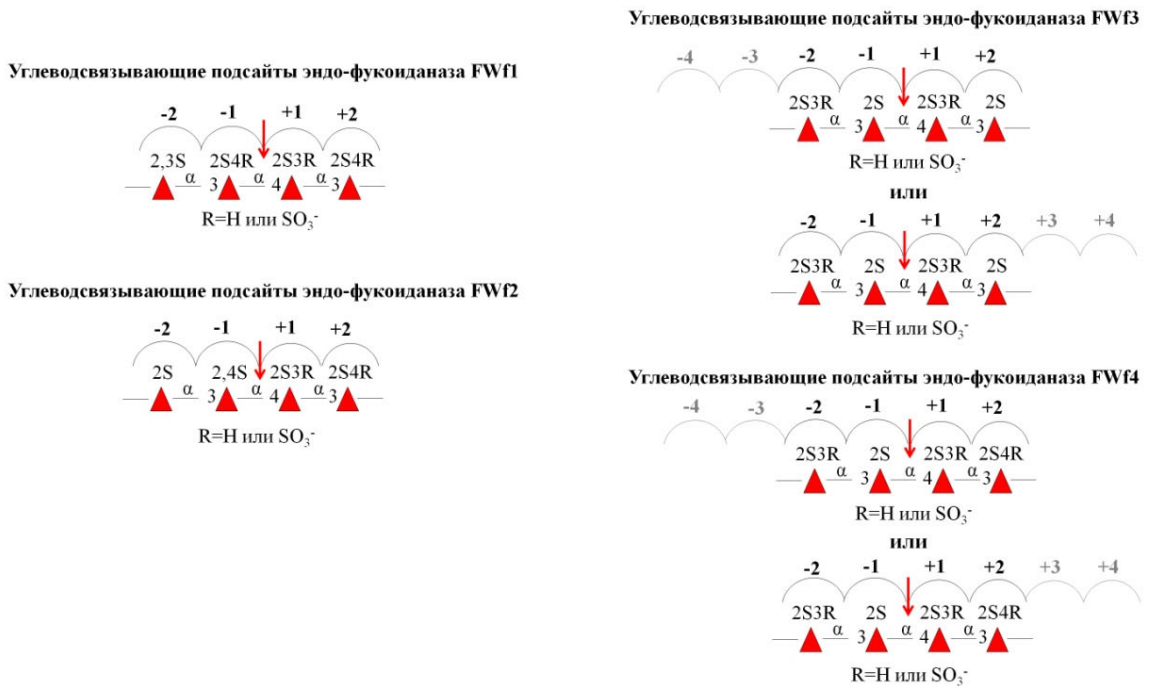


Рисунок 33 – (А) Предполагаемые сайты расщепления фукоидана, распознаваемые эндо-фукоиданазами FWf1–4, и структурные мотивы фукоидана, устойчивые к расщеплению фукоиданазами FWf1–4. (Б) Топология предполагаемых углеводсвязывающих подсайтов фукоиданаз FWf1–4. Цифры над структурными мотивами указывают на углеводсвязывающие подсайты FWf1–4. Подсайты пронумерованы в соответствии с номенклатурой [26]. (*) – сайт расщепления, предполагаемый на основании структур олигосахаридов, полученных в результате гидролиза фукоидана FeF с помощью FWf1, FWf3 или FWf4

Схожую с FWf1 топологию углеводсвязывающих подсайтов, вероятно, имеет фукоиданаза FWf3. Данный фермент так же, как и FWf1, способен расщеплять тетрасахаридные фрагменты. Следовательно, FWf3 содержит в активном центре как минимум четыре значимых углеводсвязывающих подсайта. Однако селективность подсайтов FWf3 к расположению сульфатных групп при остатках α -L-фукозы отличалась от таковой у FWf1. Наличие 2-О- и 2,4-ди-О-сульфатирования при остатках α -L-фукозы в -2 и -1 подсайтах соответственно является ключевым для распознавания и расщепления субстрата фукоиданазой FWf3. Это подтверждается наличием активности по отношению к тетрасахариду 4F2,3,4S(6S) и отсутствием таковой по отношению к другим использованным олигосахаридам. Важность присутствия 4-О-сульфатирования для гидролиза гликозидных связей фукоиданазой FWf3 была также продемонстрирована при исследовании активности этого фермента по отношению к 4-О-десульфатированным фукоиданам (см. раздел 3.6.3). Таким образом, углеводсвязывающие подсайты FWf3 способны распознавать следующие структурные фрагменты фукоиданов: $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$, а также $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ исходя из структур полученных продуктов гидролиза фукоидана FeF (Рисунок 33).

Топология углеводсвязывающих подсайтов активного центра FWf2, вероятно, значительно отличается от FWf1 и FWf3. Данный фермент расщеплял сульфатированные гекса-, окта- и декасахариды, но не тетрасахариды. Следовательно, минимальная СП участка субстрата, который может распознать и расщепить FWf2, равна 6. Таким образом, активный центр FWf2 содержит как минимум 6 значимых углеводсвязывающих подсайтов. Способность FWf2 расщеплять олигосахариды как с 2-О-сульфатированием, так и с чередующимся 2-О- и 2,3-ди-О-сульфатированием указывает на селективность подсайтов FWf2 как к 2-О-, так и к 2,3-ди-О-сульфатированным остаткам α -L-фукозы. Таким образом, FWf2 распознает повторяющиеся структурные мотивы $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_3$ и $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_3$ в молекулах фукоидана (Рисунок 33). Образование тетрасахарида во время расщепления гексасахарида 6F2S(6S) фукоиданазой FWf2 может указывать на то, что порядок подсайтов может быть либо -2 и +4, либо -4 и +2.

Попытка картировать расположение подсайтов в FWf2 с помощью синтезированных флуоресцентномеченых по восстанавливающему концу олигосахаридов не привела к положительному результату. Были получены 2-аминобензамид-меченые (2AB-меченые) производные 2-О-сульфатированных тетра-, гекса- и октасахаридов (2AB-4F2S(4S), 2AB-6F2S(6S) и 2AB-8F2S(8S)). Однако FWf2 не катализировал расщепление полученных 2AB-меченых олигосахаридов. Предположительно, неуглеводный агликон 2AB,

использованный в качестве флуоресцентной метки, препятствовал действию FWf2. Другим объяснением может быть влияние раскрытия углеводного цикла остатка α -L-фукозы, расположенного на восстанавливающем конце олигосахаридов, в результате реакции восстановительного аминирования при синтезе 2AB-производных олигосахаридов.

Так же, как и FWf2, фукоиданаза FWf4 катализировала гидролиз только гекса-, окта- и декафукоолигосахаридов с 2-О-сульфатированием и чередующимся 2-О- и 2,3-ди-О-сульфатированием. Тетрасахариды 4F2S(4S), 4F2,3S(6S), 4F2,3,4S(6S) и 4F2,3,4S(7S) не подвергались расщеплению данным ферментом. Состав продуктов расщепления указанных олигосахаридов у FWf4 и FWf2 был схожим, что указывает на схожую топологию их активных центров (количество значимых подсайтов равно 6) и специфичность по отношению к 2-О- и 2,3-ди-О-сульфатированным фрагментам фукоиданов. Можно предположить, что отличия между FWf2 и FWf4 заключаются в различной селективности некоторых из подсайтов данных ферментов к сульфатированию. Некоторые из углеводсвязывающих подсайтов (предположительно –2 подсайт) в FWf4, в отличие от FWf2, способны размещать 2,4-ди-О-сульфатированные остатки α -L-фукозы. На это указывают различия в структурах продуктов расщепления фукоидана FeF из *F. evanescens* (см. раздел 3.6.4), полученных под действием FWf4 и FWf2. Некоторые из олигосахаридов, полученных под действием FWf4, содержали единичные 2,4-ди-О-сульфатированные остатки α -L-фукозы, в то время как фукоолигосахариды, полученные под действием FWf2, содержали только 2-О-сульфатированные остатки α -L-фукозы. То есть, в отличие от FWf2, углеводсвязывающие подсайты FWf4 способны распознавать структурные фрагменты не только следующего строения: $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow]_3$ и $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow]_3$, но и $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow]_n$ и $[\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-}1\rightarrow]_n$.

Таким образом, впервые было показано, что фукоиданазы имеют комплексную специфичность, которая включает распознавание ферментами фрагментов определенной структуры. При этом специфичность фукоиданаз может различаться в отношении не только типа гликозидной связи, но и расположения сульфатных групп при остатках α -L-фукозы, находящихся в непосредственной близости от места расщепления. Специфичность предопределяется количеством и селективностью углеводсвязывающих подсайтов в активных центрах фукоиданаз.

Было показано, что исследуемые фукоиданазы FWf1–4 являются ферментами эндо-типа действия, специфичными к гидролизу 1→4-гликозидных связей между сульфатированными остатками α -L-фукозы, что позволяет классифицировать их как эндо- α -1→4-L-фукоиданазы

(шифр КФ 3.2.1.212). Однако все исследуемые ферменты расщепляют гликозидные связи в различающихся структурных фрагментах фукоиданов. При этом схема сульфатирования и протяженность фрагмента фукоидана имеет решающее значения для распознавания субстрата и его последующего гидролиза фукоиданазами. Полученные данные впервые демонстрируют, что фукоиданазы GN107 могут иметь различное количество углеводсвязывающих подсайтов, которые распознают остатки α -L-фукозы с определенным сульфатированием. Дальнейшее структурное изучение фукоиданаз позволит определить структурно-функциональные взаимосвязи.

2.6 Исследование противоопухолевой активности продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов из бурых водорослей

Известно, что фукоиданы обладают выраженной противоопухолевой активностью в отношении различных типов раковых клеток [99], однако взаимосвязь между структурными особенностями фукоиданов и проявлением противоракового действия, до сих пор изучена недостаточно. Это связано с особенностями строения молекул фукоиданов, такими как разветвленность, степень сульфатирования и нерегулярность распределения отдельных структурных элементов вдоль цепи биополимера.

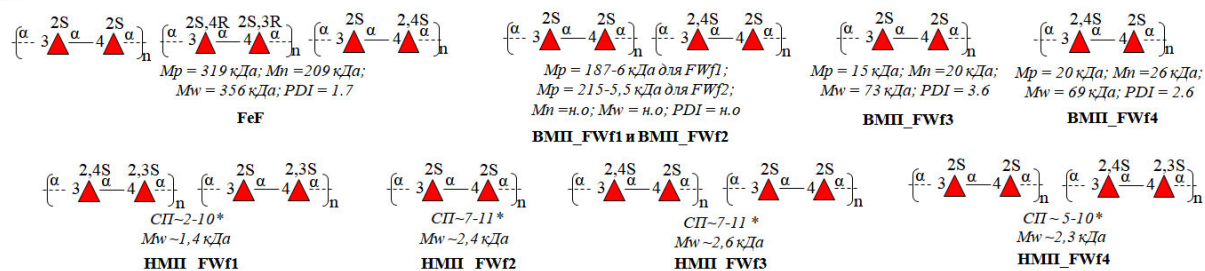
Эндо-фукоиданазы, обладающие специфичностью к определенным схемам сульфатирования, являются удобным инструментом для расщепления молекул фукоидана на олигосахариды и получения фрагментов с различными СП и специфически расположенными сульфатными группами. Такие производные могут быть использованы для выявления взаимосвязи между структурой фукоиданов и их биологической активностью. Кроме того, перспективной задачей является получение производных, обладающих более выраженной активностью.

2.6.1 Противоопухолевое действие фукоидана FeF и продуктов его ферментативного гидролиза

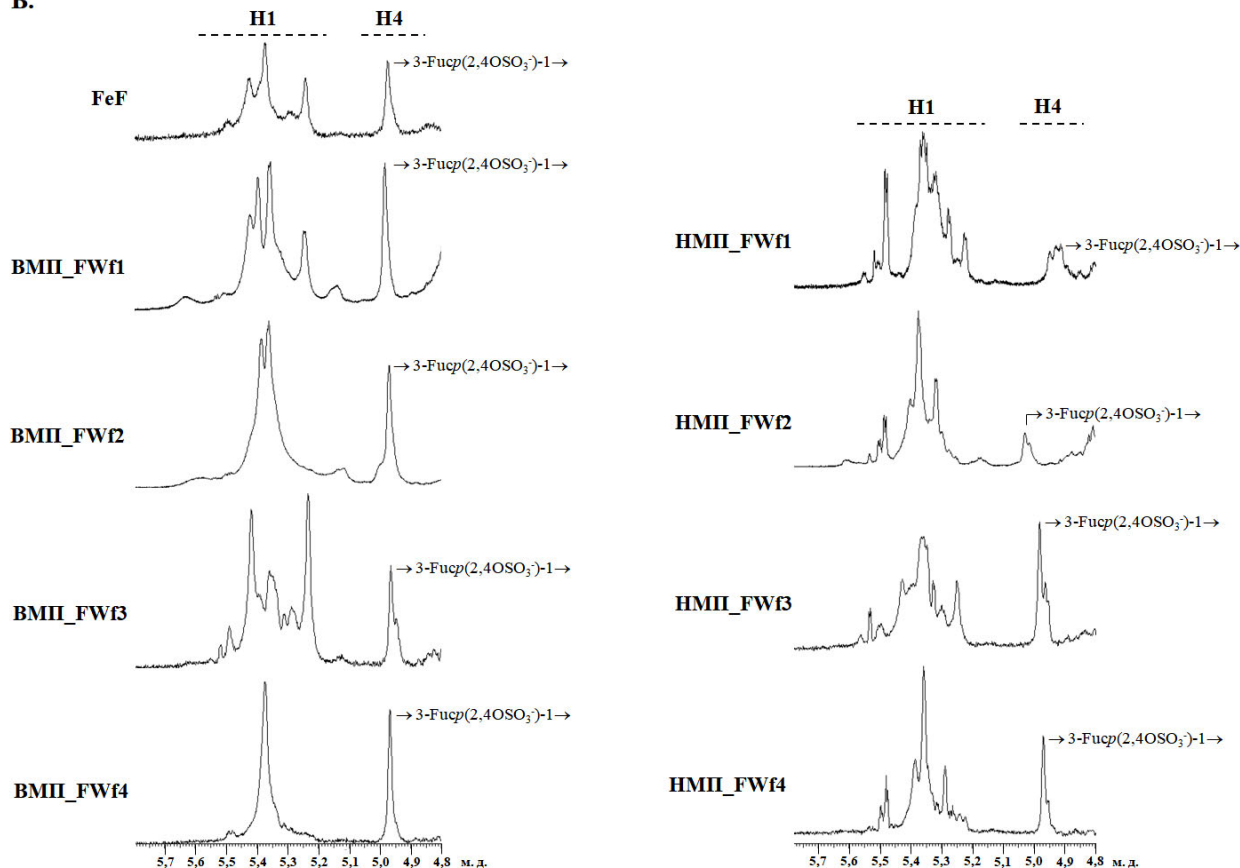
Фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* является одним из объектов исследования в ряде работ, посвященных изучению противоопухолевой активности фукоиданов [10, 12, 154, 182–185]. Этот полисахарид привлекает внимание исследователей благодаря способности эффективно ингибировать пролиферацию и образование колоний некоторых типов раковых клеток. Однако структурные особенности, определяющие характер его активности, подробно не описаны, поскольку подобные исследования требуют большого числа разнообразных модификаций полисахарида. Стоит отметить, что данная проблема является актуальной для изучения всех сложных и нерегулярных фукоиданов различных видов бурых водорослей.

Для выявления взаимосвязи между структурой фукоиданов и их противоопухолевым действием были использованы фукоидан FeF из *F. evanescens* и его ферментативные производные НМП_FWf1, НМП_FWf2, НМП_FWf3, НМП_FWf4, ВМП_FWf1, ВМП_FWf2, ВМП_FWf3 и ВМП_FWf4, полученные с помощью эндо-фукоиданаз FWf1-4. Основные структурные фрагменты, а также некоторые структурные характеристики фукоидана FeF и полученных производных приведены на Рисунке 34. Как было показано, фукоидан FeF состоит преимущественно из фрагментов следующих структур: $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ и $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$. В составе FeF также отмечено присутствие фрагментов с нерегулярным сульфатированием $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)(4\text{R})\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)(3\text{R})\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$, (где R=H или OSO_3^-). Однако содержание таких фрагментов в FeF невелико. Следовательно, наибольший вклад в потенциальное биологическое действие фукоидана FeF и его производных может вносить количественное расхождение между структурами $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ и $[\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow 4\text{-L-Fucp}(2\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow]_n$ в исследуемых соединениях. Вышеуказанные структурные фрагменты в том или ином соотношении присутствуют практически во всех полученных производных фукоидана FeF. Поэтому количественное определение содержания данных элементов структур в фукоидане FeF и полученных ферментативных производных является важным для выявления структурно-функциональных взаимосвязей. Для этого с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии был проведен анализ относительного содержания остатков $\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow$ в фукоидане FeF и его ферментативных производных. В ^1H спектрах ЯМР фукоидана FeF и его производных было рассчитано соотношение площадей сигналов, соответствующих протонам аномерной области H1 (5,1–5,7 м.д.) спектра к площади сигналов протонов H4 остатка $\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow$ (4,9–5,0 м.д.). Сумма площадей сигналов аномерной области спектров исследуемых фукоиданов была принята за 100%. Рассчитанное содержание остатков $\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow$ составило 21% для FeF, 13% для НМП_FWf1, 9% для НМП_FWf2, 24% для НМП_FWf3, 18% для НМП_FWf4, 19% для ВМП_FWf1, 21% для ВМП_FWf2, 13% для ВМП_FWf3 и 31% для ВМП_FWf4. Полученные значения содержания остатков $\rightarrow 3\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)\text{-}\alpha\text{-1}\rightarrow$ в производных фукоидана были использованы как дополнительная структурная характеристика при сравнительном изучении противораковой активности.

А.



Б.



В.

Название фракции	FeF	BMII_FWf1	BMII_FWf2	BMII_FWf3	BMII_FWf4	HMII_FWf1	HMII_FWf2	HMII_FWf3	HMII_FWf4
H1 (Σ): H4 (→3-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-)	1:0,21	1:0,19	1:0,21	1:0,13	1:0,31	1:0,13	1:0,09	1:0,24	1:0,18
Содержание →3-Fucp(2,4OSO ₃ ⁻)-, %	21	19	21	13	31	13	9	24	18

Рисунок 34 – (А) Доминирующие структурные мотивы FeF и его ферментативных производных, полученных с использованием эндо-фукоиданаз FWf1–4. Молекулярные характеристики (*M_p*, *M_n*, *M_w*, *PDI*, СП) FeF и полученных производных представлены под структурами фукоидана или его производных. (Б) Области ¹H спектров ЯМР фукоидана FeF и его производных HMII_FWf1–4 и BMII_FWf1–4, демонстрирующие сигналы протонов аномерной области H1 (5,1-5,7 м.д.) и протонов H4 остатков →3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻) (4,9 – 5,0 м.д.). В) Таблица соотношения сигналов H1 к сигналам H4 остатков →3-L-Fucp(2,4OSO₃⁻)- в фукоидане FeF и его ферментативных производных

Фукоиданы способны подавлять *in vitro* рост и развитие колоний различных типов раковых клеток [154, 185, 186]. Поэтому в экспериментах были использованы разные линии раковых клеток человека: клетки аденокарциномы протоков молочной железы MCF7, трижды негативные клетки рака молочной железы MDA-MB-231, клетки аденокарциномы толстого кишечника DLD-1, клетки аденокарциномы двенадцатиперстного кишечника HuTu 80 и клетки меланомы (меланоциты) SK-MEL-28.

Как правило, изучение противоопухолевой активности биологически активных веществ начинается с определения их токсичности по отношению к нормальным и раковым клеткам. Для этого рассматривают влияние исследуемых соединений на выживаемость (жизнеспособность) клеток и определяют концентрации, приводящие к гибели 50% клеток (IC₅₀). Показано, что ни фукоидан FeF, ни его ферментативные производные (НМП_ФWf1–4 и ВМП_ФWf1–4) не проявляли выраженного цитотоксического эффекта по отношению к нормальным эпидермальным клеткам мыши JB6 Cl41, а также различным линиям раковых клеток (MCF7, MDA-MB-231, DLD-1, HuTu 80 и SK-MEL-28) в диапазоне концентраций 200–800 мкг/мл (Рисунок 35). Даже при высокой концентрации фукоидана и его производных (800 мкг/мл) цитотоксичность по отношению к различным типам раковых клеток не превышала 20%. Это согласуется с ранее полученными данными об отсутствии цитотоксического действия фукоидана из *F. evanescens* по отношению к нормальным клеткам и различным типам опухолевых клеток в широком диапазоне концентраций [10, 154, 182–185].

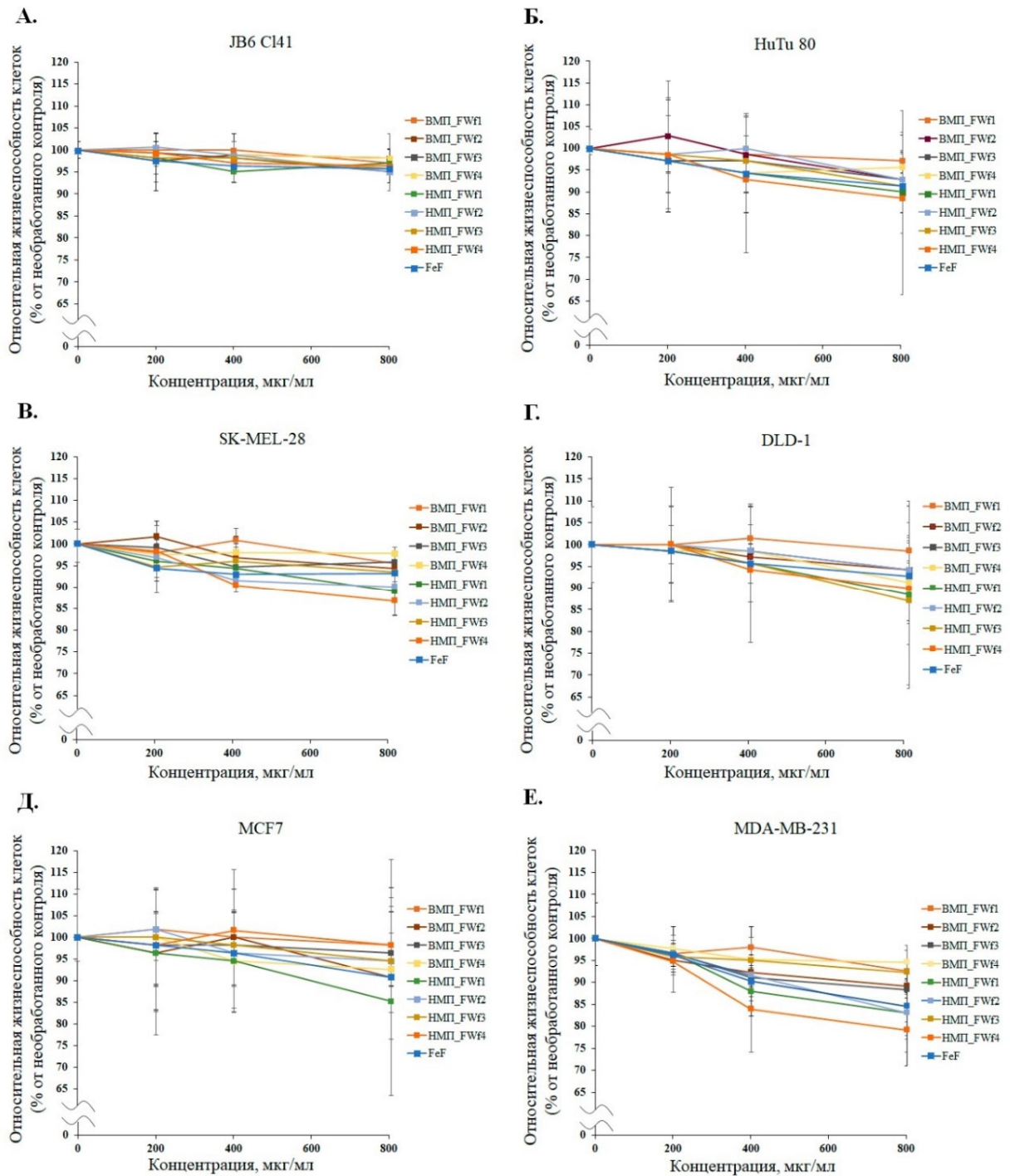


Рисунок 35 – Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (BMP1_FW1–4 и HMP1_FW1–4) в концентрациях 200, 400 и 800 мкг/мл на жизнеспособность эпидермальных клеток мыши JB6 C141 (А), клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 (Б), меланомы человека SK-MEL-28 (В), аденокарциномы толстого кишечника человека DLD-1 (Г), фиброаденомы молочной железы человека MCF7 (Д) и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Е). Относительную жизнеспособность клеток (в процентах) рассчитывали, как отношение усредненного количества клеток в лунках, обработанных FeF или его производными, к усредненному количеству не обработанных клеток в лунках (контроль)

Было исследовано *in vitro* влияние фукоидана FeF и полученных ферментативных производных в концентрации 200 мкг/мл на рост и развитие колоний различных линий раковых клеток с помощью метода «мягких агаров» [187]. Данный метод широко используется для поиска соединений, подавляющих формирование и рост опухолей *in vitro*, поскольку способность раковых клеток расти независимо от твердой поверхности является отличительной чертой канцерогенеза.

Считается, что при уменьшении молекулярной массы и увеличении степени сульфатирования фукоиданов противораковое действие усиливается [21, 158, 188]. Однако полученные данные указывают на то, что это утверждение справедливо лишь для определенных типов раковых клеток. Высокая молекулярная масса фукоидана имела ключевое значение для ингибирования роста колоний клеток рака молочной железы MCF7 (Рисунок 36, В и Г) и карциномы толстого кишечника DLD-1 (Рисунок 36, А и Б). Это подтверждается высокой ингибирующей способностью фукоидана FeF ($M_w \sim 365$ кДа) и значительно сниженной активностью его ферментативных производных, молекулярные массы которых ниже, чем у фукоидана FeF. Так, фукоидан FeF ингибировал образование колоний клеток MCF7 на 40%, в то время как все полученные высоко- и низкомолекулярные производные были практически неактивны. Способность ферментативных производных фукоидана FeF ингибировать развитие колоний клеток DLD-1 статистически достоверно снижалась с уменьшением их молекулярной массы. Фукоидан FeF ($M_w \sim 365$ кДа) ингибировал рост колоний клеток DLD-1 на 50%, высокомолекулярные производные ВМП_FWf1–4 (M_w от 5,5 до 215 кДа) на 30–40%, а низкомолекулярные производные НМП_FWf1-4 (M_w от 1,4 до 2,5 кДа) были практически не активны. При этом степень сульфатирования и расположение сульфатных групп в фукоидане FeF и его производных, очевидно, не имели решающего значения для проявления ими противораковой активности по отношению к клеткам DLD-1 и MCF7.

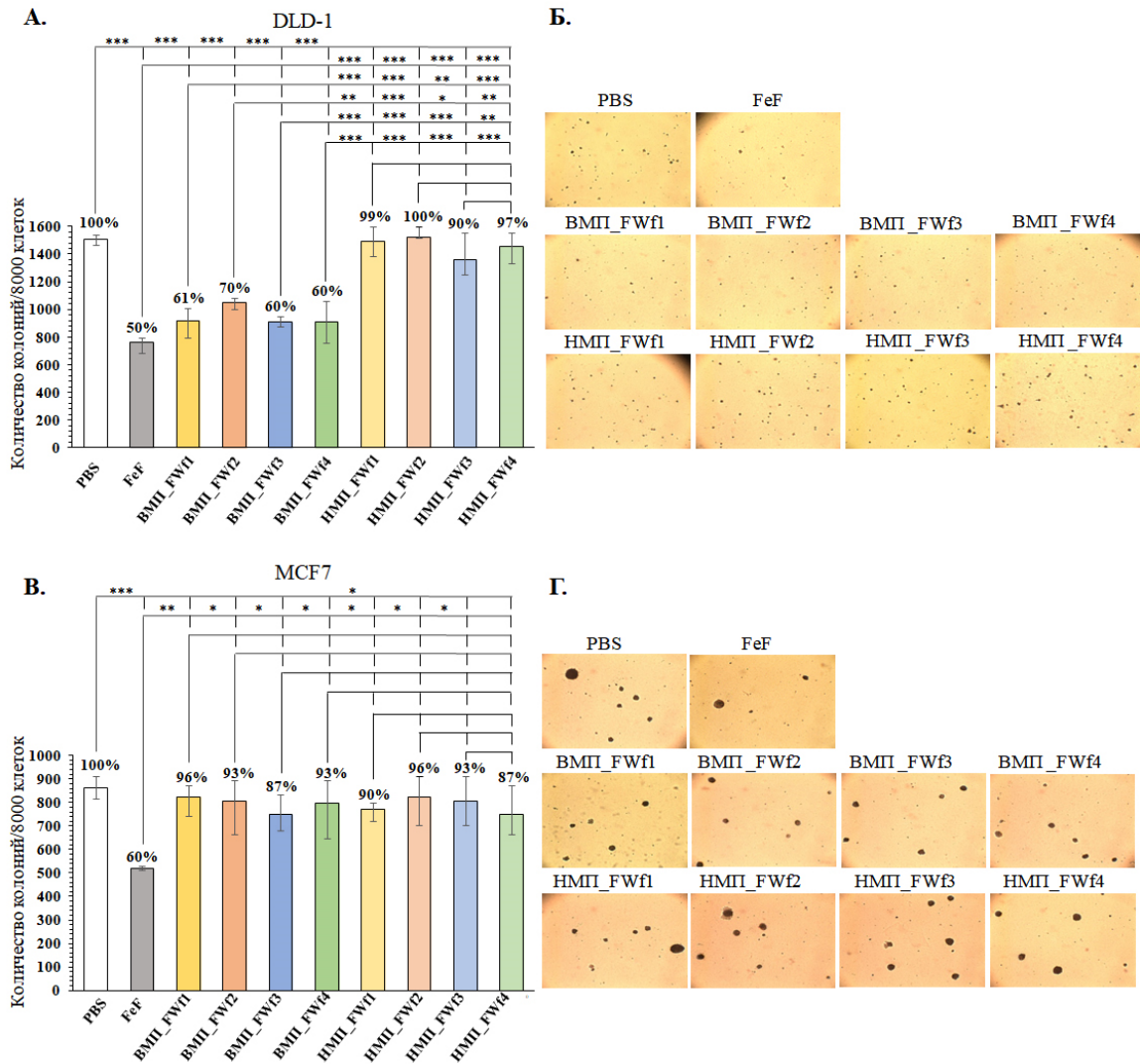


Рисунок 36 – Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (ВМП_ФВf1–4 и НМП_ФВf1–4) (200 мкг/мл) на формирование и рост колоний клеток аденокарциномы толстого кишечника человека DLD-1 (А) и фиброаденомы молочной железы человека MCF7 (В). Изображения колоний клеток DLD-1 (Б) и MCF7 (Г) после обработки либо PBS (контроль), либо FeF, либо ферментативными производными FeF. Статистические данные представлены как \pm с.о. где $n = 3$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Иной эффект исследуемых соединений был отмечен по отношению к клеткам трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 (Рисунок 37, Д и Е). Фукоидан FeF ингибировал образование колоний этих клеток на 23%, в то время как его производные ВМП_ФВf1, ВМП_ФВf2, ВМП_ФВf4, НМП_ФВf1, НМП_ФВf3, НМП_ФВf4, со сниженными по сравнению с FeF молекулярными массами, ингибировали рост колоний в среднем на 42–46%. Исключением являлись производные ВМП_ФВf3 и НМП_ФВf2, которые, несмотря на сниженную молекулярную массу, ингибировали рост колоний MDA-MB-231 лишь на 13–16%. Одним из основных отличий производных ВМП_ФВf3 и НМП_ФВf2 является их низкая степень сульфатирования – 20–23% против 25–31% у фукоидана FeF и других производных.

Это указывает на то, что клетки MDA-MB-231 более восприимчивы к низкомолекулярным фукоидам со степенью сульфатирования более 23%.

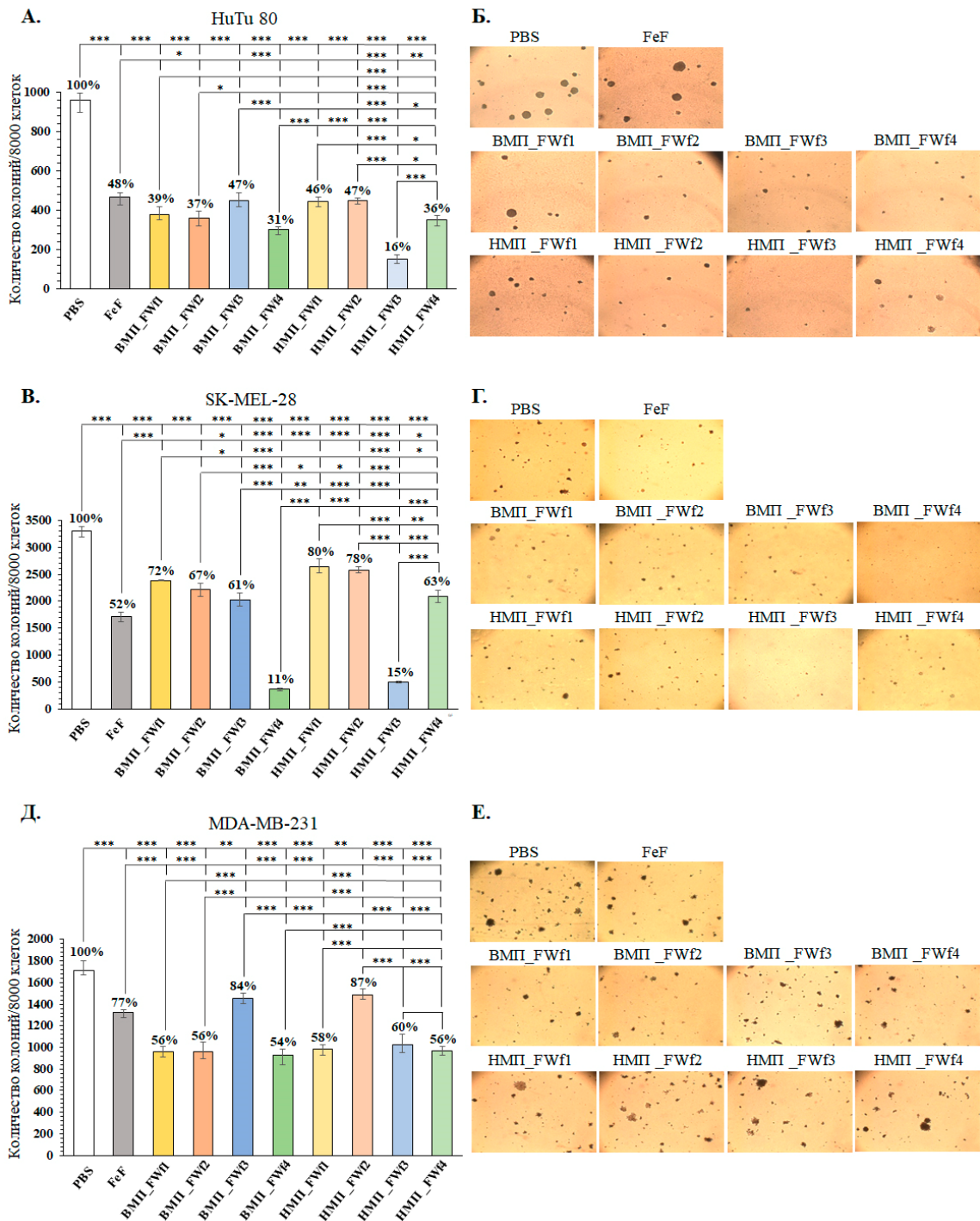


Рисунок 37 – Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (BMPI_FWf1–4 и HMPI_FWf1–4) (200 мкг/мл) на формирование и рост колоний клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 (А), меланомы человека SK-MEL-28 (Б) и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Е). Изображения колоний клеток HuTu 80 (Б), SK-MEL-28 (Г) и MDA-MB-231 (Д) после обработки либо PBS (контроль), либо FeF, либо ферментативными производными FeF. Статистические данные представлены как \pm с. о. где $n = 3$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Как и в случае с линиями клеток DLD-1 и MCF7, снижение молекулярной массы фукоидана негативно сказывалось на противораковой активности относительно клеток меланомы SK-MEL-28 (Рисунок 37, В и Г). Так, ингибирующий эффект производных ВМП_FWf1, ВМП_FWf2, ВМП_FWf3, НМП_FWf1, НМП_FWf2 и НМП_FWf4 был в среднем на 10-20% ниже, чем у нативного фукоидана FeF. При этом не наблюдалось прямой корреляции между содержанием сульфатных групп у производных фукоидана и их ингибирующим эффектом. Например, производное НМП_FWf1 со степенью сульфатирования 26% ингибировало колонии клеток SK-MEL-28 так же, как и производное НМП_FWf2 со степенью сульфатирования 20%. В то же время, наибольший ингибирующий эффект по отношению к росту колоний клеток SK-MEL-28 проявляли производные ВМП_FWf4 и НМП_FWf3. Их ингибирующая активность была на 37–41% выше, чем у нативного фукоидана FeF. Основным отличием данных производных является высокое содержание 2,4-ди-О-сульфатированных остатков α -L-фукозы в их структурах (Рисунки 34 и 38). Содержание остатков $\rightarrow 3$ -L-Fucp(2,4OSO₃⁻)- α -1 \rightarrow в ВМП_FWf4 и НМП_FWf3 составляет 31 и 24% соответственно. В фукоидане FeF и других производных содержание данных остатков не превышает 21%. Это может указывать на то, что определенное расположение сульфатных групп играет одну из ключевых ролей в ингибирующем действии фукоиданов по отношению к клеткам SK-MEL-28. Таким образом, производные фукоиданов, обогащенные 2,4-ди-О-сульфатированием, могут являться эффективными ингибиторами роста колоний данного типа клеток.

Название фракции	Mw, кДа	OSO ₃ , %	F2,4S, %	Ингибирование роста колоний, %				
				HuTu 80	SK-MEL-28	MDA-MB-231	DLD-1	MCF7
FeF	365	26	21	52	48	23	50	40
ВМП_FWf1	187-6	25	19	61	28	44	39	4
ВМП_FWf2	215-5,5	25	21	63	33	44	30	7
ВМП_FWf3	73	23	13	53	39	16	40	13
ВМП_FWf4	69	31	31	69	89	46	40	7
НМП_FWf1	1,4	26	13	54	20	42	1	10
НМП_FWf2	2,4	20	9	53	22	13	0	4
НМП_FWf3	2,5	30	24	84	85	40	10	7
НМП_FWf4	2,3	28	18	64	37	44	3	13

Рисунок 38 – Таблица, демонстрирующая некоторые структурные характеристики фукоидана FeF и его производных, а также их ингибирующее действие по отношению к росту колоний различных типов раковых клеток: HuTu 80, SK-MEL-28, MDA-MB-231, DLD-1 или MCF7. Данные об ингибирующем действии исследуемых фукоиданов по отношению к различным раковым клеткам соответствуют результатам из Рисунков 36 и 37. Цветовая маркировка применена по отношению ко всем значениям, представленным в таблице, где красный – максимальное значение в таблице, а зеленый – минимальное значение в таблице

Клетки HuTu 80 так же, как и вышеописанные клетки SK-MEL-28, были более восприимчивы к производным ВМП_FWf4 и НМП_FWf3, обогащенным 2,4-ди-О-сульфатированием (Рисунки 37 и 38). Однако эффект данных производных, по сравнению с действием на клетки SK-MEL-28, был менее выражен. При этом олигосахариды НМП_FWf3 ($M_w \sim 2,5$ кДа) на 15% эффективнее ингибировали рост колоний HuTu 80, чем фракция ВМП_FWf4 с более высокой молекулярной массой ($M_w \sim 69$ кДа). Это может указывать на положительный вклад снижения молекулярной массы производных фукоидана в их противораковый эффект относительно данного типа клеток. Таким образом, для более эффективного ингибирования роста колоний HuTu 80 производное фукоидана должно быть обогащено 2,4-ди-О-сульфатированием и иметь небольшую молекулярную массу.

Как показано, некоторые производные продемонстрировали высокую селективность по отношению к определенным типам раковых клеток (Рисунок 38). Производное НМП_FWf3 ингибировало образование колоний клеток SK-MEL-28 и HuTu 80 на 85 и 84% соответственно. Это статистически значимо превосходило ингибирующий эффект нативного фукоидана FeF по отношению к данным типам клеток на 37 и 32% соответственно (Рисунок 37). В то же время, данное производное было практически не активно по отношению к клеткам MCF7 и DLD-1 (Рисунок 36). Схожее, но менее выраженное, избирательное действие по отношению к использованным раковым клеткам наблюдалось у производных ВМП_FWf4 и НМП_FWf4. Основными структурными различиями, приводящими к таким эффектам, были 2,4-ди-О-сульфатирование и сниженная, по сравнению с фукоиданом FeF, молекулярная масса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярная масса, степень сульфатирования и расположение сульфатных групп являются важными элементами в противораковых эффектах, проявляемых фукоиданом FeF из *F. evanescens*. В то же время, важность вышеописанных структурных элементов оказалась различной для разных типов раковых клеток. К сожалению, полученные данные пока не позволяют выявить молекулярные основы, приводящие к таким эффектам. Можно предположить, что раковые клетки, использованные в экспериментах, имеют различные число, уровень экспрессии и/или регуляции потенциальных мишеней, на которые способны действовать фукоиданы. При этом для взаимодействия с каждой из таких потенциальных мишеней важны определенные структурные элементы фукоиданов.

Структурная модификация фукоиданов исследованными ферментами позволила выявить некоторые элементы структуры, ответственные за усиленный *in vitro* противораковый эффект фукоиданов. С помощью рекомбинантных фукоиданаз получены производные фукоидана FeF, которые значительно превосходят противораковый эффект нативного фукоидана по отношению к определенным типам раковых клеток. Это демонстрирует потенциал применения

исследуемых ферментов для получения производных фукоиданов с усиленным биологическим действием.

2.6.2 Действие фукоидана FeF и продуктов его ферментативного гидролиза на образование колоний опухолевых клеток и неопластическую трансформацию нормальных клеток, индуцированные эпидермальным фактором роста

Канцерогенез — многофазный и сложный процесс, характеризующийся неконтролируемым ростом и распространением атипичных клеток. Роль эпидермального фактора роста (EGF) и его рецептора в процессе регуляции клеточной пролиферации хорошо известна [189]. Связывание рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с лигандом (EGF), который индуцирует фосфорилирование тирозина и димеризацию рецептора с другими членами семейства тирозинкиназных рецепторов ERBB, приводит к усиленной неконтролируемой пролиферации. Неконтролируемая пролиферация раковых клеток часто связана с нарушением регуляции этого процесса или аномальной экспрессией EGFR. Такие атипичии характерны для многих агрессивных типов рака и оказывают влияние на их рост, метастазирование и выживаемость при злокачественных состояниях. Поэтому EGFR привлекает большое внимание как молекулярная мишень для разработки противораковых терапевтических средств. Одним из перспективных способов предотвращения развития и прогрессирования некоторых форм рака является ингибирование запускаемых EGF сигнальных путей [190, 191]. Поиск ингибиторов неопластической клеточной трансформации среди природных источников является перспективным направлением химиопрофилактики рака [192–195].

Нормальные эпидермальные клетки мыши JB6 и их клональные генетические варианты представляют собой уникальную модель, характеризующуюся их дифференциальной реакцией на неопластическую трансформацию, индуцированную промоторами опухоли [196–198]. Поэтому клеточная линия JB6 C141 широко используется для изучения неопластической трансформации нормальных клеток в опухолевые и поиска потенциальных ингибиторов данного процесса. Однако канцерогенные факторы, в частности EGF, способны оказывать влияние и на клетки злокачественных образований [199–201]. Путь эпидермального фактора роста (EGF) играет важную роль в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) раковых клеток и метастазировании и, соответственно, способствует прогрессированию и разрастанию опухоли [202]. Поэтому поиск соединений, предотвращающих действие опухолевого промотора EGF на клетки злокачественных образований, является не менее перспективным направлением в терапии рака.

Канцеропреентивная активность фукоиданов из *Saccharina guryanovae* (ранее *Laminaria guryanovae*) и *S. cichorioides* (ранее *L. cichorioides*) по отношению к неопластической трансформации клеток JB6 C141 описана в нескольких публикациях [163, 164]. Однако структурные элементы фукоиданов, ответственные за их канцеропреентивное действие, ранее не были рассмотрены в деталях.

Анализ образования колоний в мягком агаре является хорошо зарекомендовавшим себя тестом на злокачественную трансформацию клеток *in vitro*. Поэтому он был использован для определения канцеропреентивной активности фукоидана FeF и его ферментативных производных. Нормальные эпидермальные клетки мыши JB6 C141 самопроизвольно не формируют колонии в мягком агаре. При обработке клеток JB6 C141 EGF (20 нг/мл) происходит их трансформация и, как следствие, формирование колоний (Рисунок 39). Показано, что фукоидан FeF и продукты его ферментативной трансформации в концентрации 200 мкг/мл способны эффективно подавлять этот процесс. При этом действие фукоидана FeF и его производных на формирование и рост колоний клеток JB6 C141, индуцированное EGF, существенно различалось. Фукоидан FeF снижал количество колоний клеток JB6 C141 на 59% по сравнению с контролем. Производные ВМП_FWf1, ВМП_FWf2, ВМП_FWf3, ВМП_FWf4, НМП_FWf3 и НМП_FWf4 статистически достоверно снижали количество колоний исследуемых клеток на 84–97%. Таким образом, данные производные в среднем на 25–38% эффективнее подавляли трансформацию клеток JB6 C141, чем нативный фукоидан FeF. Это свидетельствует о положительном влиянии снижения молекулярной массы фукоиданов на их способность подавлять трансформацию эпидермальных клеток мыши JB6 C141, индуцированную EGF. В тоже время низкомолекулярные производные НМП_FWf1 и НМП_FWf2 имели менее выраженный эффект по сравнению с FeF и другими производными. Данные производные в концентрации 200 мкг/мл снижали количество колоний клеток JB6 C141 лишь на 23 и 33% относительно контроля. Основным отличием низкомолекулярных производных НМП_FWf1 и НМП_FWf2 является их низкая молекулярная масса (1,4–2,4 кДа) и небольшое содержание 2,4-ди-О-сульфатированных остатков α -L-фукозы (13 и 9% соответственно). Вместе с тем производное ВМП_FWf3, которое ингибировало образование колоний на 66–56% эффективнее, чем производные НМП_FWf1 и НМП_FWf2, имеет в своем составе близкое количество 2,4-ди-О-сульфатированных остатков α -L-фукозы (13%). Молекулярная масса у ВМП_FWf3 69 кДа, что значительно выше, чем у НМП_FWf1 и НМП_FWf2 (1,4 и 2,4 кДа соответственно). Это позволяет предположить, что снижение молекулярной массы фукоиданов до определенного предела вносит положительный вклад в наблюдаемый канцеропреентивный эффект, но дальнейшее уменьшение массы приводит к снижению активности. В случае низкомолекулярных производных НМП_FWf3 и НМП_FWf4,

обладающих высокой ингибирующей активностью, отрицательный эффект от их низкой молекулярной массы может быть компенсирован высоким содержанием 2,4-ди-О-сульфатирования, которое, вероятно, вносит положительный вклад в наблюдаемый канцеропреентивный эффект. Можно предположить, что высокое содержание 2,4-ди-О-сульфатирования и сниженная до определенного предела молекулярная масса (предположительно, в пределах от 150 до 5 кДа) фукоиданов являются важными структурными детерминантами для подавления трансформации нормальных эпидермальных клеток мыши, индуцированной EGF. Вместе с тем нельзя исключать возможное влияние других структурных детерминант, присутствующих в полученных производных. Например, определенного распределения сульфатных групп в их основных цепях. Дальнейшее изучение межмолекулярных взаимодействий между полученными производными фукоидана и EGF/EGFR должно внести ясность в наблюдаемые эффекты.

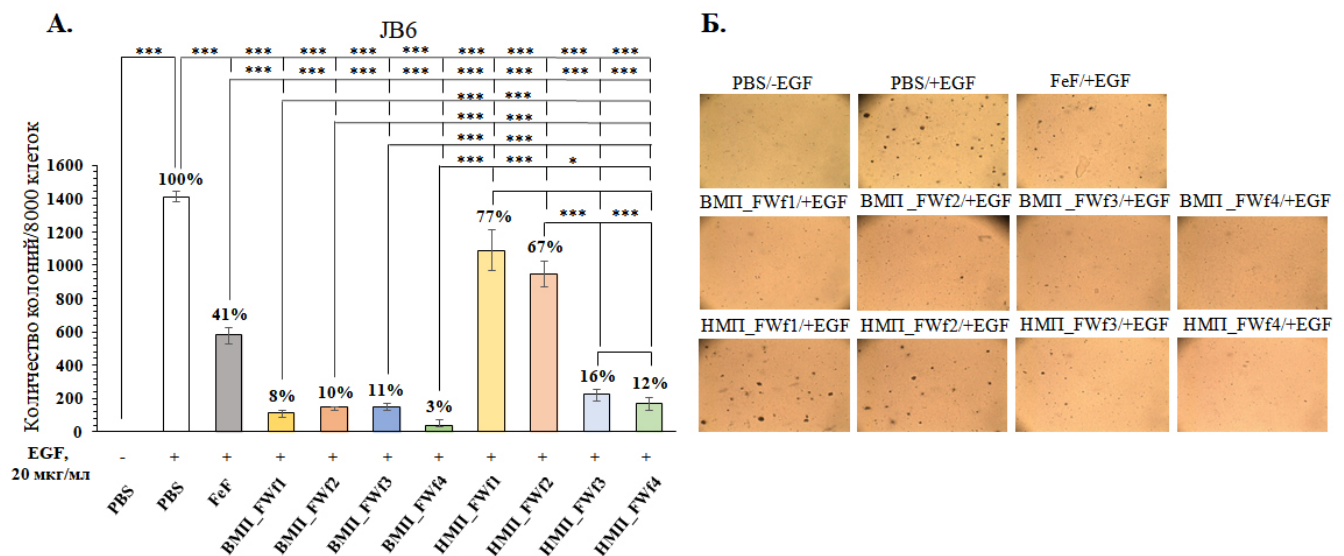


Рисунок 39 – (А) Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (БМП_FWf1–4 и НМП_FWf1–4) (200 мкг/мл) на EGF-индуцированное формирование и рост колоний нормальных эпидермальных клеток мыши JB6 C141 после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл), либо EGF и FeF, либо EGF (20 нг/мл) и ферментативными производными FeF. (Б) Изображения колоний клеток JB6 C141 после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл), либо EGF и FeF, либо EGF и ферментативными производными FeF. Статистические данные представлены как ± с.о., где n = 3 (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Следующим этапом было изучение действия фукоидана и его производных на рост колоний, индуцированный EGF, в опухолевых клетках. Раковые клетки обладают способностью самопроизвольно формировать колонии на поверхности агара (метод мягких агаров). Показано, что при обработке EGF раковых клеток наблюдается увеличение количества их колоний. При этом увеличение количества колоний было разным для различных типов раковых клеток. Так,

при обработке EGF (20 нг/мл) клеточных линий HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1 и MCF7 количество колоний увеличивалось на 22%, 71%, 90% и 19% соответственно (Рисунок 40). Таким образом, наиболее восприимчивыми к обработке EGF были клетки DLD-1 и SK-MEL-28, в то время как клетки HuTu80 и MCF7, вероятно, подвержены воздействию EGF в меньшей степени.

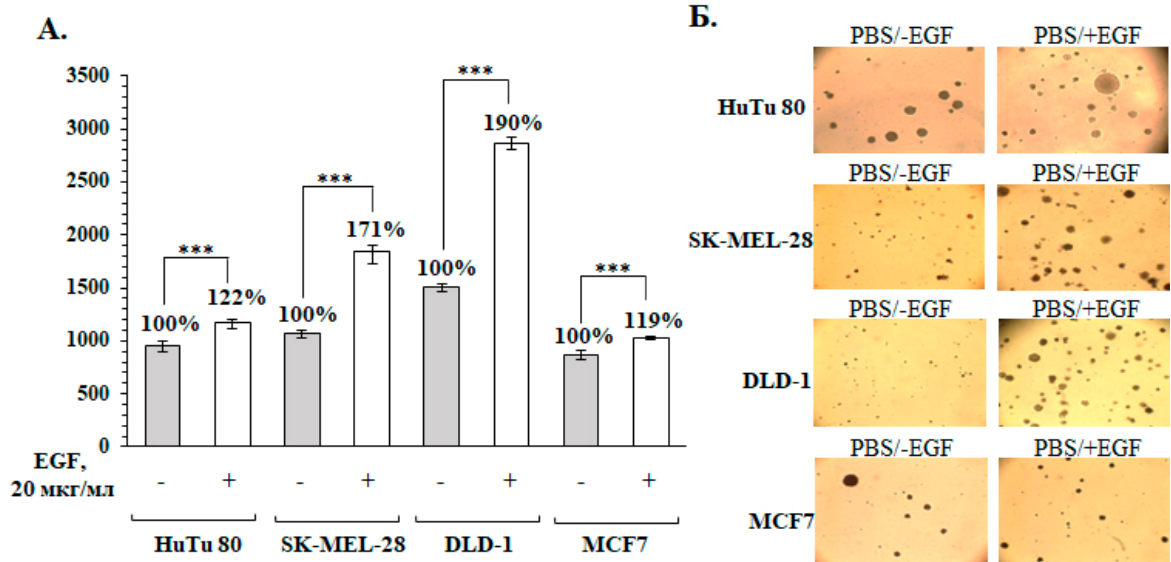


Рисунок 40 – (А) Влияние EGF (20 нг/мл) на формирование и рост колоний клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80, меланомы человека SK-MEL-28, аденокарциномы толстого кишечника человека DLD-1 и фиброаденомы молочной железы человека MCF7.

(Б) Изображения колоний клеток HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1 и MCF7 после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл). Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n = 3$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

До настоящего времени в литературных источниках не сообщалось об исследованиях потенциала фукоиданов в отношении ингибирования формирования колоний раковых клеток, индуцированного EGF. Нами была изучена способность фукоидана FeF и полученных производных снижать количество колоний различных типов раковых клеток, которые формируются после обработки EGF.

Поскольку используемые фукоиданы способны ингибировать процесс самопроизвольного образования колоний раковых клеток, то для расчета данного эффекта были использованы два контроля, без обработки EGF (-EGF) и с обработкой (+EGF). Снижение количества колоний клеток ниже контроля (-EGF) считали противоопухолевым действием. Снижение количества колоний раковых клеток относительно контроля (+EGF) считали канцерпревентивным действием.

Обработка клеток фукоиданом FeF и его производными в концентрациях 200 мкг/мл во всех случаях приводила либо к полному, либо к значительному снижению количества колоний

различных типов раковых клеток, обработанных EGF (Рисунки 41, 42 и 43). Таким образом, фукоиданы, как и в случае с нормальными клетками JB6 Cl41, способны снижать эффект от воздействия опухолевого промотора EGF по отношению к различным типам раковых клеток. Стоит отметить, что при одновременном наложении двух различных эффектов (канцеропреventивного и противоопухолевого) достаточно сложно оценить вклад каждого из них по отдельности. По этой причине сложно выявить структурные элементы фукоиданов, ответственные за усиленный канцеропреventивный эффект по отношению к раковым клеткам. Поэтому значения канцеропреventивного действия фукоиданов стоит считать условными, а полученные данные предварительными.

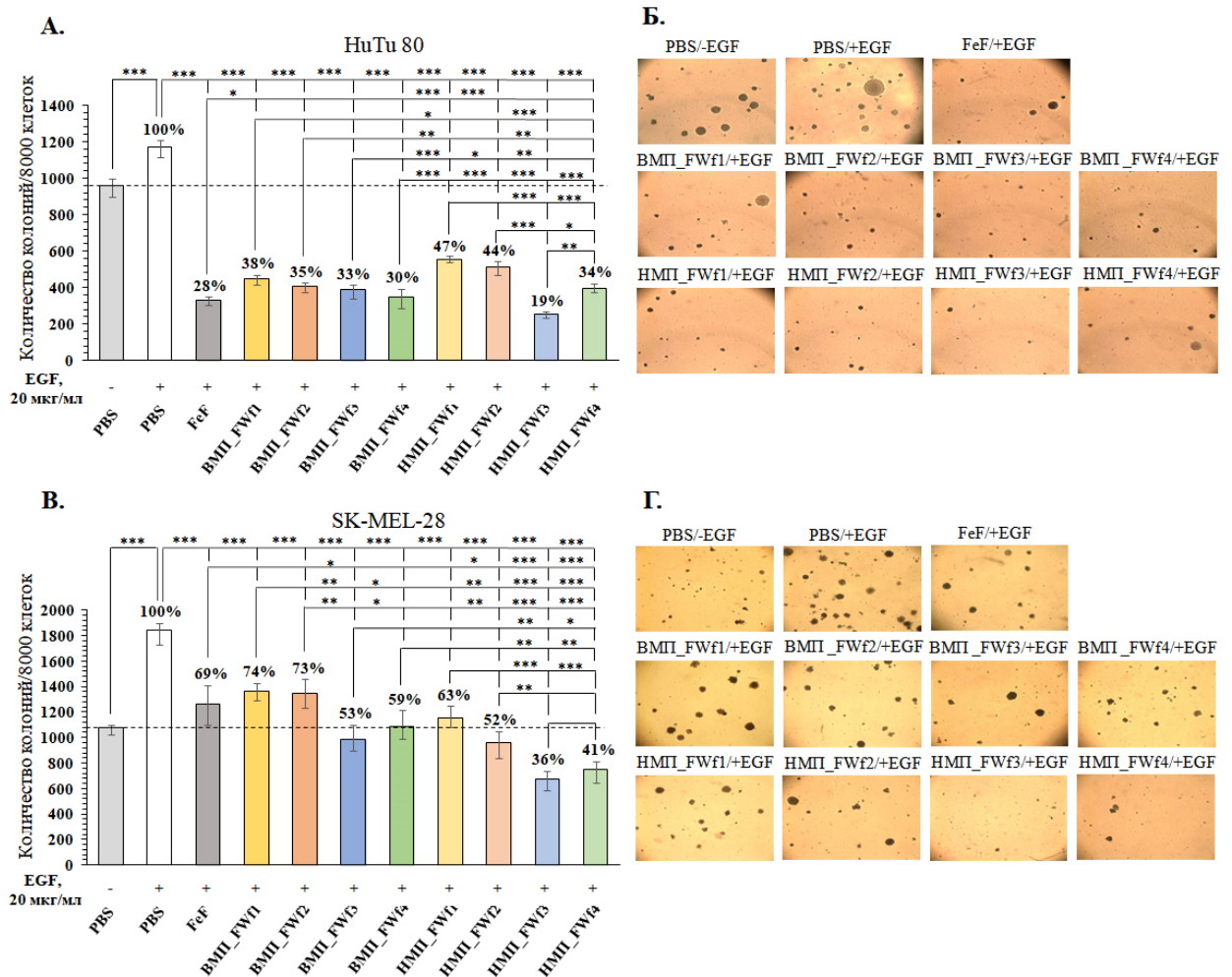


Рисунок 41 – Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (BMPI_FWf1–4 и HMPI_FWf1–4) (200 мкг/мл) на формирование и рост колоний клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 (А) и меланомы человека SK-MEL-28 (В), индуцированные EGF. Изображения колоний клеток HuTu 80 (Б) и SK-MEL-28 (Г) после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл), либо EGF и FeF, либо EGF и ферментативными производными FeF. Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n = 3$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

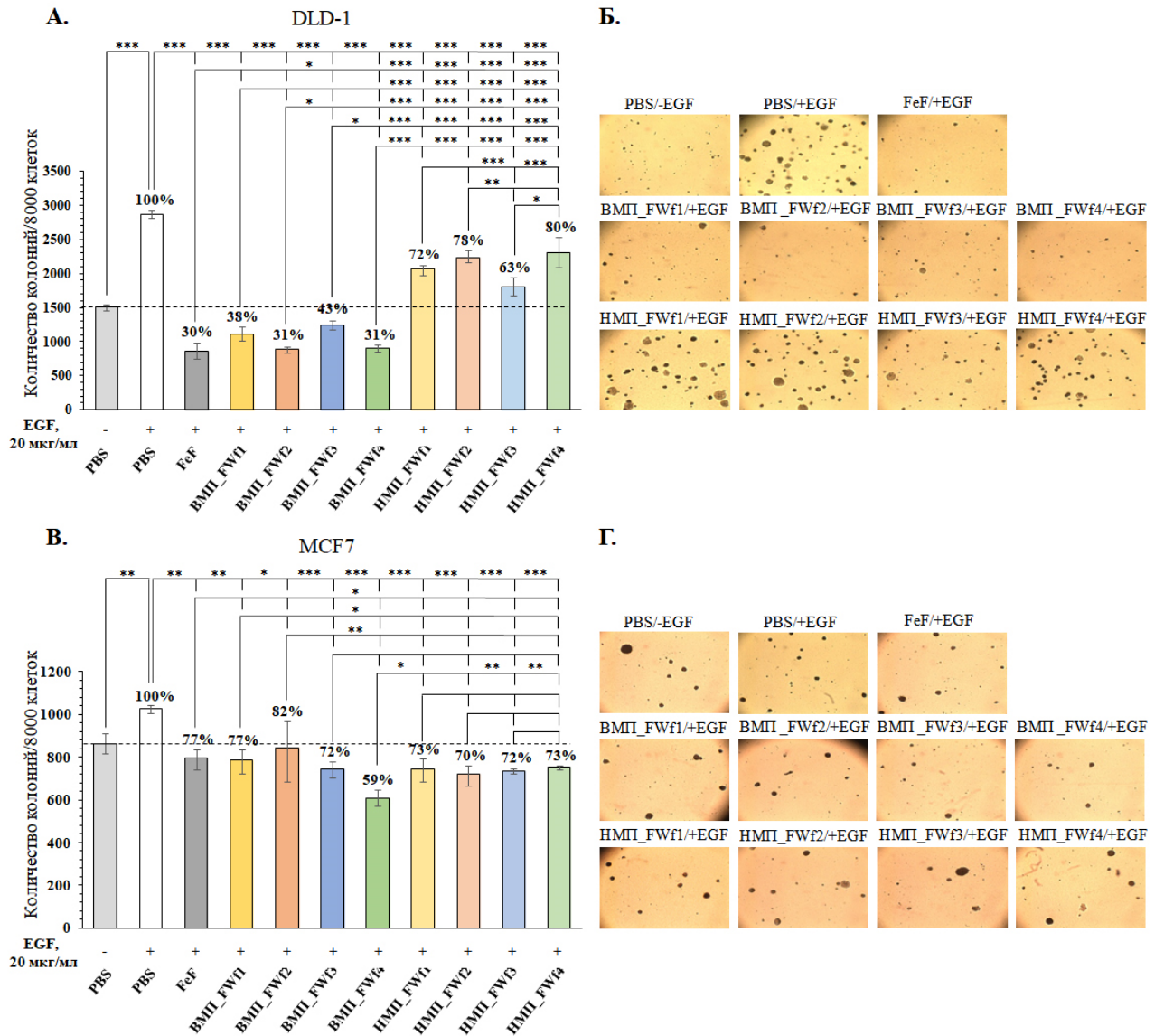


Рисунок 42 – Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (ВМП_FWf1–4 и НМП_FWf1–4) (200 мкг/мл) на формирование и рост колоний клеток аденокарциномы толстого кишечника человека DLD-1 (А) и фиброаденомы молочной железы человека MCF7 (В), индуцированные EGF. Изображения колоний клеток DLD-1 (Б) и MCF7 (Г) после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл), либо EGF и FeF, либо EGF и ферментативными производными FeF. Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n = 3$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Название вещества	Mw, кДа	OSO ₃ , %	F2,4S, %	Ингибирование роста колоний, %							
				HuTu 80		SK-MEL-28		DLD-1		MCF7	
				(+EGF)*	(-EGF)*	(+EGF)*	(-EGF)*	(+EGF)*	(-EGF)*	(+EGF)*	(-EGF)*
FeF	365	26	21	72	65	31	н.а.	70	43	23	8
ВМП_FWf1	187-6	25	19	62	53	26	н.а.	62	28	23	8
ВМП_FWf2	215-5,5	25	21	65	57	27	н.а.	69	41	18	2
ВМП_FWf3	73	23	13	67	59	47	9	57	19	28	14
ВМП_FWf4	69	31	31	70	63	41	н.а.	69	41	41	30
НМП_FWf1	1,4	26	13	53	42	37	н.а.	28	н.а.	27	13
НМП_FWf2	2,4	20	9	58	46	48	10	22	н.а.	30	17
НМП_FWf3	2,5	30	24	81	76	64	37	37	н.а.	28	14
НМП_FWf4	2,3	28	18	66	58	59	29	20	н.а.	27	13

Рисунок 43 – Таблица, демонстрирующая ингибирующую активность фукоидана FeF и его производных по отношению к различным линиям раковых клеток: HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1 и MCF7, обработанным EGF (20 нг/мл). (+EGF)* – значения ингибирующей активности по отношению к контрольным клеткам, обработанным EGF. (-EGF)* – значения ингибирующей активности по отношению к контрольным клеткам без обработки EGF. Цветовая маркировка применена по отношению ко всем значениям, представленным в таблице, где красный – максимальное значение в таблице, а зеленый – минимальное значение в таблице, «н.а.» – нет активности

Поскольку эксперименты, описанные в главе 2.6.1, проводились одновременно с исследованием канцеропреентивного действия фукоиданов, то это позволило сравнить действие фукоиданов по отношению к раковым клеткам до и после их обработки EGF. Сравнительный анализ позволил выявить некоторые различия в действии исследуемых фукоиданов (Рисунок 44).

Название вещества	Mw, кДа	OSO ₃ , %	F2,4S, %	Ингибирование роста колоний, %							
				HuTu 80		SK-MEL-28		DLD-1		MCF7	
				1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
FeF	365	26	21	52	65	48	н.а.	50	43	40	8
ВМП_FWf1	187-6	25	19	61	53	28	н.а.	39	28	4	8
ВМП_FWf2	215-5,5	25	21	63	57	33	н.а.	30	41	7	2
ВМП_FWf3	73	23	13	53	59	39	9	40	19	13	14
ВМП_FWf4	69	31	31	69	63	89	н.а.	40	41	7	30
НМП_FWf1	1,4	26	13	54	42	20	н.а.	1	н.а.	10	13
НМП_FWf2	2,4	20	9	53	46	22	10	0	н.а.	4	17
НМП_FWf3	2,5	30	24	84	76	85	37	10	н.а.	7	14
НМП_FWf4	2,3	28	18	64	58	37	29	3	н.а.	13	13

Рисунок 44 – Таблица, демонстрирующая различия в характере ингибирующего действия фукоидана FeF и его производных (200 мкг/мл) по отношению к различным линиям раковых клеток с (2*) и без (1*) обработки EGF (20 нг/мл). Данные об ингибирующем действии фукоиданов по отношению к раковым клеткам без обработки EGF (1*) взяты из Рисунка 38 главы 2.6.1. Данные об ингибирующем действии фукоиданов по отношению к раковым клеткам после обработки EGF (2*) взяты из Рисунка 43, столбец (-EGF)*. Относительная цветовая маркировка применена для столбцов 1* и 2* для каждого из типов раковых клеток, где красный – максимальное значение в столбцах 1* и 2*, а зеленый – минимальное значение в этих столбцах, «н.а.» – нет активности

Показано, что обработка EGF раковых клеток HuTu 80 не приводила к значимому снижению степени или изменению характера ингибирования формирования колоний данного типа клеток фукоиданом FeF и его производными. Как и в случае с необработанными EGF клетками, производные ВМП_FWf4 и НМП_FWf3 обладали наибольшей противораковой активностью по отношению к HuTu 80. Другая ситуация наблюдалась в отношении клеток DLD-1, MCF7 и SK-MEL-28. Как было показано, клетки MCF7 без обработки EGF были наиболее восприимчивы к действию только нативного фукоидана FeF (Рисунок 36). Ферментативные производные фукоидана FeF практически не влияли на количество колоний MCF7. После обработки клеток MCF7 эпидермальным фактором роста фукоидан FeF, так же, как и большинство его производных, не снижал количество колоний в сравнении с контролем (-EGF) (Рисунки 42 и 43). В то же время производное ВМП_FWf4, не активное до обработки клеток EGF, достоверно снижало на 30% количество колоний клеток MCF7, после обработки EGF. Схожее, но менее выраженное, изменение характера ингибирования производными фукоидана наблюдалось в отношении клеток DLD-1, обработанных EGF. Значительное снижение степени и изменение характера ингибирования формирования колоний производными фукоидана также наблюдалось по отношению к обработанным EGF клеткам SK-MEL-28. Изменения характера ингибирования образования колоний раковых клеток, индуцированного EGF, различными производными фукоидана указывает на то, что EGF способен модулировать восприимчивость раковых клеток к тем или иным структурным детерминантам фукоиданов. Такие изменения, вероятно, могут быть обусловлены процессами, протекающими в клетках после обработки эпидермальным фактором роста. Активация EGFR факторами роста запускает множество клеточных сигнальных каскадов и влияет на метаболизм, рост, а также развитие клеток [203]. Это, в свою очередь, может влиять на уровень экспрессии потенциальных мишеней, с которыми могут взаимодействовать фукоиданы.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что важность определенных структурных элементов фукоиданов, ответственных за их усиленное противораковое действие, может различаться не только по отношению к различным типам раковых клеток, но и зависеть от определенных экзогенных факторов, воздействующих на раковые клетки.

2.7 Применение фукоиданазы FWf1 для изучения структуры фукоидана из *A. angusta*

Ферменты с установленной специфичностью являются эффективным инструментом для изучения структур субстратов. В данной работе фукоиданазы FWf1–4 были использованы для установления основных структурных фрагментов фукоидана из бурой водоросли *A. angusta*.

Наибольшую гидролитическую активность по отношению к фукоидану, выделенному из бурой водоросли *A. angusta* (1AaF2)⁴, среди исследуемых рекомбинантных фукоидаз проявили FWf1 и FWf3. Они деполимеризовали 1AaF2 с образованием олигосахаридов и резистентной высокомолекулярной фракции. Для получения производных фукоидана 1AaF2 была выбрана фукоидаза FWf1. Фукоидан 1AaF2 был гидролизован ферментативным способом с получением высоко- и низкомолекулярных продуктов (ВМП_1AaF2 и НМП_1AaF2) с выходами 45 и 42% относительно веса исходного фукоидана. Анализ моносахаридного состава фракций 1AaF2 и ВМП_1AaF2 показал, что они представляют собой галактофуканы (Таблица 5).

Таблица 5 – Структурные характеристики фукоидана 1AaF2 и его высокомолекулярного ферментативного производного

Название фракции	-SO ₃ Na, %*	Моносахаридный состав, моль%						
		L-Fuc	L-Rha	D-Gal	D-Glc	D-Man	D-Xyl	UA
1AaF2	33	64	0	36	0	0	0	0
ВМП_1AaF2	19	52	0	48	0	0	0	0

Примечание: * – % от массы образца

Согласно данным, полученным с помощью гельпроникающей хроматографии, молекулярные массы исходного фукоидана и полученного высокомолекулярного производного составили около 835 и 829 кДа соответственно (Рисунок 45). Вероятно, исходный фукоидан 1AaF2 состоял из смеси двух практически равных по молекулярной массе полисахаридов, один из которых был полностью деполимеризован на олигосахариды в результате действия фукоидазы FWf1, а другой являлся резистентным к действию фермента. Это объясняет отсутствие различий между молекулярными массами 1AaF2 и ВМП_1AaF2. Более подробные структурные характеристики 1AaF2 и ВМП_1AaF2 (результаты ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии) не представлены в данной работе⁵.

⁴ Фракция 1AaF2 была выделена и предоставлена для исследований сотрудниками лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Усольцевой Р.В. и Сурицем В.В.

⁵ Структурная характеристика была выполнена сотрудниками лаборатории химии ферментов, Сурицем В.В., к.х.н. Усольцевой Р.В., к.х.н. Расиным А.Б., а также сотрудником лаборатории физико-химических методов исследования, к.х.н. Анастюком С.Д.

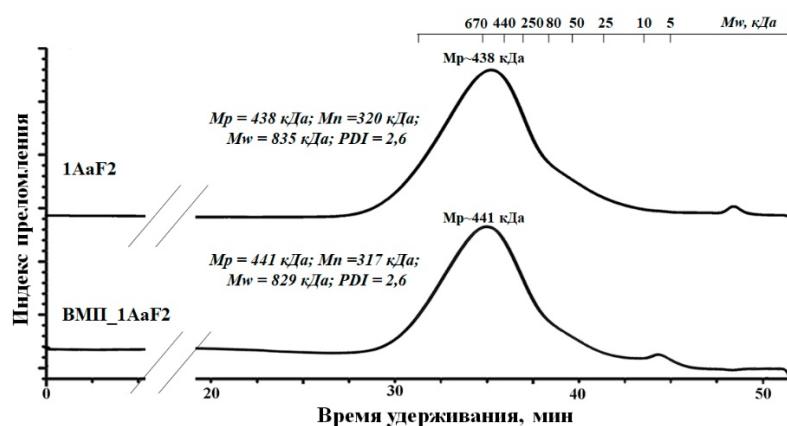


Рисунок 45 – Анализ параметров молекулярной массы фукоидана 1AaF2 и его ферментативного производного ВМП_1AaF2 с помощью гелипроникающей хроматографии на последовательно соединенных колонках Shodex OHpak SB-805 HQ и OHpak SB-803 HQ. Параметры M_p , M_n , M_w и PDI образцов фукоидана рассчитывали с использованием стандартных декстранов. M_w – молекулярная масса; M_n – среднечисловая молекулярная масса; M_p – молекулярная масса, соответствующая максимуму хроматографического пика; PDI – индекс полидисперсности

Фракция НМП_1AaF2 была подвергнута разделению на колонке с анионообменным носителем Q-Sepharose HP в линейном градиенте концентраций NH_4HCO_3 для получения гомогенных фукоолигосахаридов (Рисунок 46). В результате разделения были получены пять гомогенных олигосахаридов 1AaF2-Фр1, 1AaF2-Фр2, 1AaF2-Фр3, 1AaF2-Фр4 и 1AaF2-Фр5 с выходами 0,25% (1 мг), 1,25% (5 мг), 0,5% (2 мг), 3% (12 мг) и 2,5% (10 мг) соответственно.

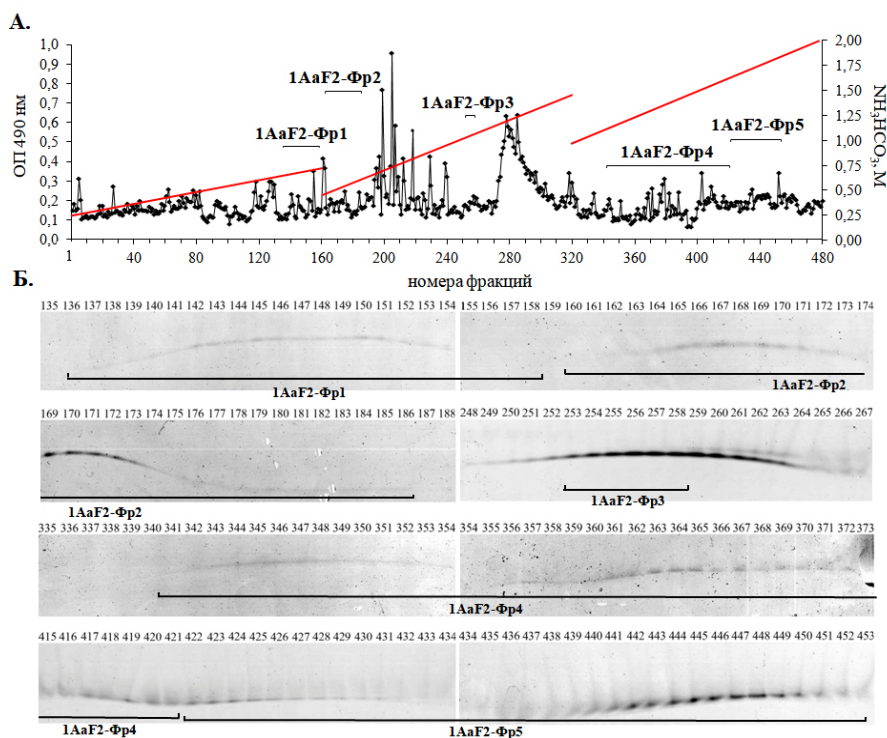


Рисунок 46 – (А) Профили элюирования НМП ферментативного гидролиза 1AaF2, полученных с помощью фукоиданазы FwF1 с колонки с анионообменным носителем Q-Sepharose HP. (Б) Электрофореграммы полученных фракций НМП

Структуры полученных олигосахаридов были установлены с помощью ЯМР-спектроскопии с использованием одно- и двумерных методик (^1H , COSY, ROESY)⁶. Анализ спектров ЯМР показал, что 1AaF2-Фр2 представляет собой дисахарид со структурой $\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{OSO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{OSO}_3^-)$. Олигосахариды 1AaF2-Фр4 и 1AaF2-Фр5 являлись тетрасахаридами, отличающимися друг от друга количеством и расположением сульфатных групп при остатках $\alpha\text{-L-фукозы}$ (Рисунок 47) (таблицы соотнесения сигналов см. в Приложении 6).

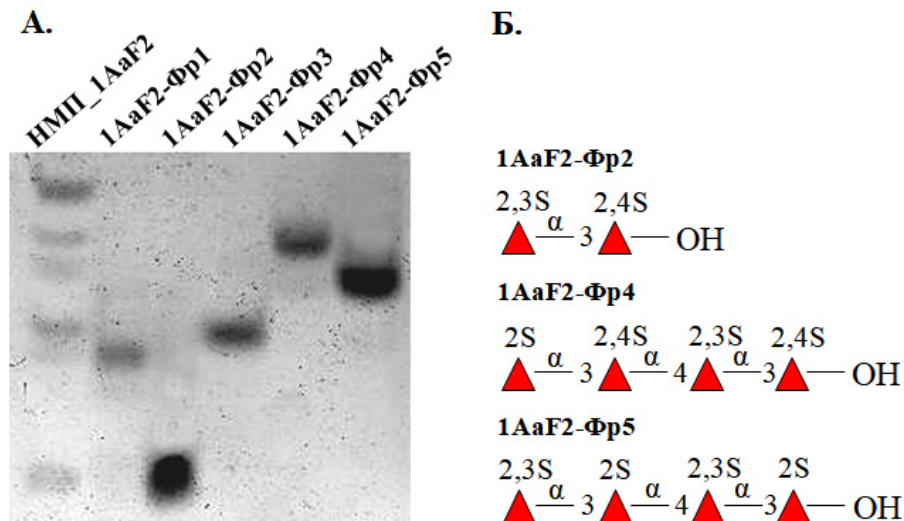


Рисунок 47 – Электрофореграмма (А) и схематическое изображение (Б) структур выделенных олигосахаридов – продуктов ферментативного гидролиза фукоидана 1AaF2, полученных с помощью фукоиданазы FWf1

Таким образом, с помощью ферментативной деполимеризации фукоидана с последующим установлением строения производных можно получить информацию о его основных структурных характеристиках. Такой метод установления структур полисахаридов, в частности фукоиданов, имеет ряд преимуществ по сравнению с химическими методами, поскольку подразумевает более мягкие условия, позволяющие сохранить исходное сульфатирование полисахарида.

2.7.1 Противоопухолевое и канцеропреентивное действие фукоидана 1AaF2 и высокомолекулярных продуктов его ферментативного гидролиза

Было показано, что фукоидан из бурой водоросли *A. angusta* 1AaF2 состоит из двух структурно различающихся полисахаридов: сульфатированный 1 \rightarrow 3-; 1 \rightarrow 4- $\alpha\text{-L-фукан}$ и устойчивый к действию фермента сульфатированный и ацелированный комплекс

⁶ Запись спектров ЯМР была проведена сотрудником лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Расиным А.Б. Анализ спектров ЯМР был проведен к.х.н. Расиным А.Б. и сотрудником лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Усольцевой Р.В.

фукогалактана (Fuc: Gal ~ 1: 2; 19% сульфатов). Фракция ВМП_1AaF2, полученная с помощью фукоиданазы FWF1, содержала протяженные фрагменты 1→3-связанных остатков α -L-фукозы и 1→3-, 1→4-связанные остатки галактозы (до 5 остатков)⁷. Фукоидан 1AaF2 и его высокомолекулярное производное ВМП_1AaF2 не проявляли цитотоксического эффекта по отношению к клеткам JB6 C141 и SK-MEL-28 в концентрациях от 50 до 800 мкг/мл (Рисунок 48).

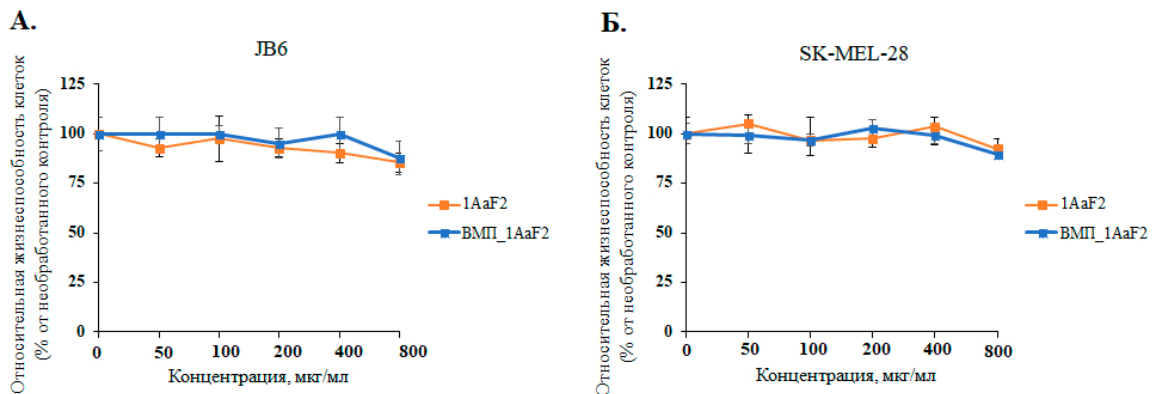


Рисунок 48 – Влияние фукоидана 1AaF2 и его высокомолекулярного ферментативного производного (ВМП_1AaF2) в концентрациях 50, 100, 200, 400 и 800 мкг/мл на жизнеспособность эпидермальных клеток мыши JB6 C141 (А) и клеток меланомы человека SK-MEL-28 (Б). Относительную жизнеспособность клеток (в процентах) рассчитывали, как отношение усредненного количества клеток в лунках, обработанных 1AaF2 или ВМП_1AaF2, к усредненному количеству не обработанных клеток в лунках (контроль)

Анализ противоопухолевой активности нативного фукоидана 1AaF2 и его ферментативного производного ВМП_1AaF2 с помощью метода мягкого агара показал, что ВМП_1AaF2 является более эффективным ингибитором самопроизвольного образования колоний клеток SK-MEL-28. Обе полисахаридные фракции не оказывали влияния на формирование колоний клеток SK-MEL-28 при низкой концентрации 50 мкг/мл (Рисунок 49, А и Б). В концентрации 100 мкг/мл фукоидан 1AaF2 также не проявлял ингибирующего эффекта, в то время как ВМП_1AaF2 в той же концентрации подавлял образование колонии SK-MEL-28 на 14% по сравнению с контролем. Более высокая активность 1AaF2 и ВМП_1AaF2 в отношении образования колоний клеток SK-MEL-28 наблюдалась при концентрациях 200–400 мкг/мл и составляла 13–18% и 29–30% соответственно. Ранее было исследовано влияние другой фракции галактофукана из *A. angusta* и ее десульфатированных и деацетилированных производных (100 мкг/мл) на клетки SK-MEL-28. Было показано, что исследованные галактофуканы очень слабо ингибировали образование колоний данного типа клеток (до 6% по сравнению с контролем) [204].

⁷ Структурные характеристики фракций получены сотрудниками лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Сильченко А.С. и Сурицем В.В.

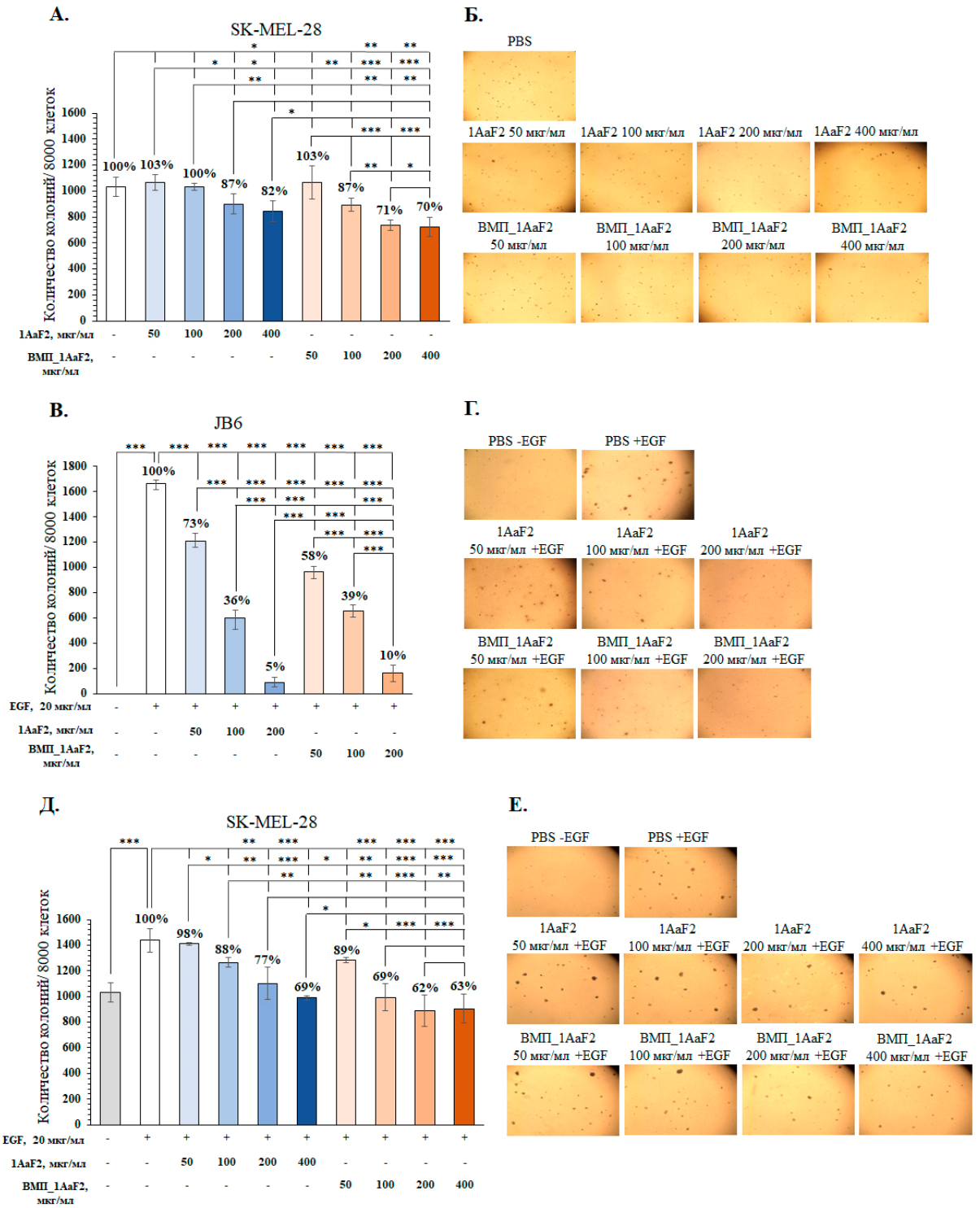


Рисунок 49 – Влияние фукоидана 1AaF2 и его высокомолекулярного ферментативного производного (БМП_1AaF2) в различных концентрациях на самопроизвольное формирование и рост колоний клеток меланомы человека SK-MEL-28 (А) и формирование и рост колоний эпидермальных клеток мыши JB6 C141 (В) и клеток меланомы человека SK-MEL-28 (Д), индуцированные EGF. Изображения колоний клеток SK-MEL-28 (В, Е) и JB6 C141 (Г) после обработки различными комбинациями PBS, EGF, 1AaF2 и БМП_1AaF2 (обозначены в таблицах под графиками). Статистические данные представлены как ± с.о., где n = 3 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

Исследуемые фракции 1AaF2 и ВМП_1AaF2 обладали дозозависимым канцеропреентивным действием и эффективно подавляли процесс неопластической трансформации клеток JB6 C141, вызванный EGF. Исходный фукоидан 1AaF2 ингибировал трансформацию клеток JB6 C141 на 27, 64 и 95% в концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл соответственно; а ВМП_1AaF2 – на 42, 61 и 90% в тех же концентрациях (Рисунок 49, В и Г).

Клетки меланомы SK-MEL-28 также обрабатывали EGF, что приводило к увеличению числа колоний в мягком агаре на 40% по сравнению с контролем, не обработанным EGF (Рисунок 49, Д и Е). Хорошо выраженное ингибирующее действие 1AaF2 и ВМП_1AaF2 на формирование колоний клеток SK-MEL-28, индуцированное EGF, наблюдалось при концентрациях 200–400 мкг/мл. В этом случае число колоний клеток SK-MEL-28 практически совпадало с количеством колоний в контроле, не обработанном EGF, то есть происходило полное ингибирование данного процесса. При обработке клеток исследуемыми фракциями в более низких концентрациях (100 и 200 мкг/мл) подавление формирования колоний не было настолько выраженным, а ингибирование достигло 12 и 23% соответственно для 1AaF2 и 31 и 38% соответственно для ВМП_1AaF2 (Рисунок 49, Д и Е).

Согласно полученным данным, фракция ВМП_1AaF2 демонстрирует более выраженные канцеропреентивную и ингибирующую активности в отношении клеток SK-MEL-28, чем фракция 1AaF2. В то же время канцеропреентивный эффект этих полисахаридов по отношению к трансформации клеток JB6 C141, индуцированной EGF, варьирует в зависимости от их концентраций. Вероятно, различия в проявляемых противоопухолевых эффектах обусловлены структурными особенностями исследуемых соединений. В отличие от устойчивой к действию фермента Fw1 фракции фукогалактана ВМП_1AaF2 исходный 1AaF2 представляет собой смесь структурно различных полисахаридов, и необходимо учитывать вклад в биологический эффект 1→3-; 1→4- α -L-фукана.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Материалы и реагенты

Материалы и реагенты: органические растворители, неорганические кислоты и соли (чда) производства «Реахим» (Россия). Акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (бис-акриламид), глицин, трис (2-гидроксиметил-2-метил-1,3-пропандиол), глицерин – фирмы «PanReac AppliChem» (Германия), додецилсульфат натрия (ДСН), β -меркаптоэтанол (β -МЭ), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), агароза, персульфат аммония (ПСА), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 2-аминобензамид (2-АВ) – коммерческие препараты фирмы «Sigma-Aldrich» (США), изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) фирмы «Helicon» (Россия). Целлюлозоацетатные мембраны (размер пор 0,22 и 0,45 мкм) и мембраны для ультрафильтрации Amicon® Ultra 15 mL Filters (предел отсечения 50 кДа) фирмы «Millipore» (США).

Стандартные белки: бычий сывороточный альбумин (БСА) производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США), набор белков для ПААГ-электрофореза «Precision Plus Protein Standards» 10–250 кДа фирмы «Bio-Rad» (США).

Реактивы для культивирования бактерий: триптон, дрожжевой экстракт фирмы «Диа-М» (Россия), ампициллин, гентамицин, тетрациклин, хлорамфеникол производства «Sigma-Aldrich» (США).

Среды для культивирования клеток: питательные среды «Minimum Essential Medium Eagle» (MEM), «Dulbecco's Modified Eagle's Medium» (DMEM), «Roswell Park Memorial Institute Medium» (RPMI 1640), «Basal Medium Eagle» (BME), натрий-фосфатный буфер (PBS), пенициллин, стрептомицин, L-глутамин, трипсин производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США), эмбриональная телячья сыворотка (FBS) фирмы «Biowest» (США), агар фирмы «Becton» (Франция), эпидермальный фактор роста (EGF) фирмы «ПанЭко» (Россия). Клеточные линии (Таблица 6) получены из Американской коллекции клеточных культур (АТСС).

Таблица 6 – Клеточные культуры

Клеточные линии	Аббревиатура	АТСС номер	Питательная среда
Эпидермальные клетки мыши	JB6 Cl41	АТСС® no. CRL-2010™	MEM, 5% FBS
Клетки меланомы человека	SK-MEL-28	АТСС® no. HTB-72™	DMEM, 10% FBS
Клетки аденокарциномы толстого кишечника человека	DLD-1	АТСС® no. CCL-221™	RPMI 1640, 10% FBS
Клетки аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека	HuTu 80	АТСС® no. HTB-40™	MEM, 10% FBS
Клетки фиброаденомы молочной железы человека	MCF7	АТСС® no. HTB-22™	DMEM, 10% FBS
Клетки аденокарциномы молочной железы человека	MDA-MB-231	АТСС® no. HTB-26™	DMEM, 10% FBS

Красители: толуидиновый синий, этидиумбромид, бромфеноловый синий, кумасси G-250, феноловый красный – коммерческие препараты фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

Носители для хроматографических методов: носитель для анионообменной хроматографии Q-Sepharose HP, картридж для аффинной хроматографии «HisTrap™ HP» (5 мл), картридж для гельпроникающей хроматографии «HiTrap™ Desalting» (5 мл) производства фирмы «GE Healthcare» (США), носитель для анионообменной хроматографии DEAE-MacroPrep – фирмы «Bio-Rad» (США).

Реагенты для работы с ДНК: ДНК-полимераза высокой точности «Phusion High-Fidelity» (2000 ед./мл), буферный раствор для ДНК-полимеразы «Phusion High-Fidelity» (5x), диметилсульфоксид (ДМСО, 100%) и рестриктаза DpnI (20 000 ед./мл) производства фирмы «New England Biolabs» (США). Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ по 10 мМ) производства фирмы «Bio-Rad» (США). Набор для выделения геномной ДНК бактерий «Gen Elut Bacterial Genomic DNA Kit» – фирмы «Sigma-Aldrich» (США), набор для выделения плазмидной ДНК – фирмы «Евроген» (Россия), маркеры длин ДНК «1 kb DNA ladder, reqGOLD» 250-10000 п. о. – фирмы «VWR International» (США), набор для выделения продуктов ПЦР – фирмы «Евроген» (Россия).

Штаммы бактерий: штаммы *E. coli*: Arctic Express (DE3), BL21-Gold (DE3)pLysS, BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, BL21-Star (DE3)pLysS фирмы «Agilent» (США), XL 10-Gold фирмы «Stratagene» (США). Штамм бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T был приобретен в Корейской коллекции типовых культур (Центр биологических ресурсов, Корейский научно-исследовательский институт биологических наук и биотехнологии) (КСТС № 42864).

Субстраты: образцы бурой водоросли *S. horneri* были собраны в июле 2016г., Бухта Хуцюань, Желтое море, Циндао, Китай; *S. cichorioides* – в сентябре 2015г., *U. pinnatifida* – в июле 2015г., бухта Троица, Японское море, Дальний Восток, Россия; *F. evanescens* – в августе 2017г., остров Итуруп, Курильские острова, Дальний Восток, Россия; *A. angusta* – в августе 2012г., остров Симушир, Охотское море, Дальний Восток, Россия. Фукоидан из *F. vesiculosus* – коммерческий, производства «Sigma-Aldrich» (США).

Фукоиданы из бурых водорослей *S. horneri*, *S. cichorioides*, *U. pinnatifida*, *F. evanescens* и *A. angusta* были получены по методам, описанным или процитированным в работе [205].

Сульфатированные фукоолигосахариды (4F2,3,4S(7S), 4F2,3S(6S), 6F2,3S(6S), 8F2,3S(12S), 10F2,3S(15S)) были получены путем ферментативного гидролиза фукоидана из

S. horneri с помощью рекомбинантной эндо-фукоиданазы FFA1 из морской бактерии *Formosa algae* KMM3553^T, как описано в работе [51].

3.2 Общие методы исследования

3.2.1 Определение общих сахаров

Содержание общих сахаров в образцах определяли фенол-сернокислотным методом [206].

3.2.2 Определение содержания сульфатных групп

Содержание сульфатных групп в полисахаридах и их производных оценивали с помощью турбидиметрического метода [207].

3.2.3 Определение моносакхаридного состава полисахаридов

Образцы полисахаридов (5 мг) подвергали гидролизу 4 N трифторуксусной кислоты (ТФУ) при 100 °C (6 ч). Моносакхаридный состав продуктов кислотного гидролиза проводили с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD) на хроматографе Agilent 1260 Infinity II («Agilent», США), снабженным электрохимическим детектором DECADE Elite («Antec Scientific», Нидерланды). Анализ проводили на колонке CarboPac PA1 (25 см × 4 см, «Thermo Fisher», США). Элюирование моносакхаридов проводили линейным градиентом (от 3 до 5 mM) NaOH в течение 26 мин с последующим линейным градиентом (от 100 до 200 mM) NaOAc в 100 mM NaOH в течение 15 мин. Моносакхариды (L-Fuc L-Rha, D-Gal, D-Glc, D-Man, D-Xyl, D-GalA, D-GlcA) и использовали в качестве стандартов.

3.2.4 Определение концентрации белка

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Брэдфорда [208] или Лоури [209]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) с концентрациями от 0,065 до 2,0 мг/мл (растворы стандартов готовили методом двойного разбавления). Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного спектрофотометра PowerWave XS («Biotek», США) при длине волны 595 нм.

3.2.5 ДСН-ПААГ электрофорез белков

Гомогенность целевых белков и их молекулярную массу оценивали с помощью ДСН-ПААГ электрофореза по протоколу Лэммли [210]. Электрофорез проводили в 12%-ом акриламидном геле с добавлением детергента – додецилсульфата натрия (ДСН). В качестве стандарта использовали маркер молекулярной массы белков (10–250 кДа) Precision Protein

Plus™ («Bio-rad», США). Изображения геля были получены с помощью сканирующего денситометра GS-800 («Bio-Rad», США). Концентрации белков в ферментных препаратах оценивали по оптической плотности полос с использованием БСА в качестве стандарта. Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре PowerWave XS («Biotek», США). Молекулярные массы белков и их концентрации рассчитывали с использованием программного обеспечения QuantityOne 4.6.7 («Bio-Rad», США).

3.3 Методы биоинформатического анализа

3.3.1 Идентификация фукоиданедеградирующего кластера

Геном *W. fucanilytica* CZ1127^T (GenBank: GCA_001697185.1) был проанализирован для выявления последовательностей, сходных с известными фукоиданазами, принадлежащими к 107 семейству гликозидгидролаз (CAZy). Для поиска были использованы последовательности фукоиданаз FcnA (GenBank: CAI47003.1), Fda1 (GenBank: AAO00508.1), Fda2 (GenBank: AAO00509.1) и SVI_0379 (GenBank: BAJ00350.1). Идентификацию предполагаемых генов фукоиданаз проводили с использованием основного инструмента поиска локального выравнивания (BLAST) относительно всех белков бактерии *W. fucanilytica* с использованием аннотированной сборки генома GenBank (GenBank: GCA_001697185.1). В геноме морской бактерии *W. fucanilytica* идентифицированы четыре гена фукоиданаз. Гены, находящиеся в непосредственной близости от генов фукоиданаз, были вручную аннотированы с использованием сервера InterProScan V5 («EMBL-EBI», Великобритания) и базы данных CAZy [211, 212]. В результате был идентифицирован локус, предположительно участвующий в деполимеризации фукоидана. Идентификацию аминокислотных последовательностей фукоиданаз проводили с использованием сервиса Clustal Omega («EMBL-EBI», Великобритания) [213] и программного обеспечения Jalview V3 («ELIXIR-UK», Великобритания) [214].

3.3.2 Анализ аминокислотных последовательностей фукоиданаз

Аминокислотные последовательности гипотетических фукоиданаз AXE80_07305 (названная FWf1, GenBank: ANW96097.1), AXE80_07310 (названная FWf2, GenBank: ANW96098.1), AXE80_07420 (названная FWf3, GenBank: ANW96115.1) и AXE80_07425 (названная FWf4, GenBank: ANW96116.1) из *W. fucanilytica* CZ1127^T, а также последовательности фукоиданаз FcnA (GenBank: CAI47003.1), Fda1 (GenBank: AAO00508.1), Fda2 (GenBank: AAO00509.1), FFA1 (GenBank: WP_057784217.1), FFA2 (GenBank: WP_057784219.1), SVI_0379 (GenBank: BAJ00350.1), P5AFcnA (GenBank: AYP59291.1),

P19DFcnA (GenBank: AYC59292.1), Fp273 (GenBank: AYC81238.1), Fp277 (GenBank: AYC81239.1) и Fp279 (GenBank: AYC81240.1) были использованы для сравнительного анализа.

Наличие сигнальных последовательностей в белках было предсказано с помощью веб-сервиса SignalP v3.0 [215]. Для предсказания доменной организации белков были использованы инструменты InterProScan V5 («EMBL-EBI», Великобритания) и NCBI Conserved Domain Database (CDD) [216]. Границы доменов в полипептидных цепях фукоиданаз корректировали вручную путем их попарного выравнивания с помощью алгоритма MAFFT («EMBL-EBI», Великобритания) [217]. Аминокислотные последовательности фукоиданаз FcnA и P5AFcnA с известными пространственными структурами и основными характеристиками из морских бактерий *M. fucanivorans* SW5 и *Psychromonas* sp. SW5A соответственно были использованы в качестве эталонных последовательностей (шифр Protein Data Bank (PDB): 6DLH (усеченная форма Gln29-Ser734 FcnA, названная MfFcnA4), 6DMS (мутантная форма H294Q FcnA, названная MfFcnA4), 6DNS (усеченная форма Gln29-Asp623 FcnA, названная MfFcnA9) и 6M8N (названная P5AFcnA)).

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей фукоиданаз и вычисление процента идентичности были выполнены с использованием алгоритма Clustal Omega («EMBL-EBI», Великобритания) [213] и программного обеспечения Jalview («ELIXIR-UK», Великобритания) [214].

3.3.3 Построение моделей трехмерных структур фукоиданаз

Для построения пространственных моделей FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4, основанных на гомологии аминокислотных последовательностей, был использован сервер SWISS-MODEL [218]. В качестве шаблона была использована пространственная модель эндо-фуканазы MfFcnA4 морской бактерии *M. fucanivorans* SW5 (шифр PDB: 6DLH) с ранее установленной трехмерной структурой [47]. Минимизация энергии полученных структур проводилась с помощью приложения Yet Another Scientific Artificial Reality Application (YASARA) (версия 17.8.10, «YASARA Bioscience GmbH», Австрия) [219]. Оценка параметров качества построенных моделей была проведена с помощью сервера QMEAN [220]. Оценка пространственной укладки предсказанных доменов, входящих в состав фукоиданаз, была проведена путем анализа структур полноразмерных пространственных моделей фукоиданаз, содержащихся в базе данных AlfaFold [221]. Визуализацию моделей фукоиданаз, а также структурный анализ активных центров, доменов и сайтов связывания кальция проводили с использованием PyMol (система молекулярной графики PyMOL, версия 1.8, «Schrödinger», США). Атомы кальция накладывали на полученные структуры FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 путем структурного выравнивания с MfFcnA4 (шифр PDB: 6DHL). Остатки L-фукозы

позиционировали в предполагаемые активные центры исследуемых фукоиданаз путем структурного выравнивания пространственных моделей фукоиданаз и α -L-фукозидазы семейства GH29 в комплексе с лакто-N-фукопентаозой II (Le^a антигеном) (шифр PDB: 3UET).

3.4 Методы получения рекомбинантных фукоиданаз

3.4.1 Выделение и очистка геномной ДНК

Штамм морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T был предоставлен для работы сотрудником лаборатории микробиологии ТИБОХ ДВО РАН, к.б.н. Куриленко В.В. Биомасса клеток данного штамма была получена культивированием при температуре 24 °С на питательной среде «Морской агар 2216» («Becton Dickinson», США) к.б.н. Куриленко В.В. Выделение и очистку геномной ДНК из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T проводили с использованием набора Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit фирмы «Sigma-Aldrich» (США) в соответствии с рекомендациями производителя.

3.4.2 Получение генетических конструкций фукоиданаз

Генетические конструкции, содержащие усеченные гены, кодирующие область Ile2–Pro733 FWf1 (GenBank: ANW96097.1), область Gln36–Asn883 FWf2 (GenBank: ANW96098.1), область Leu2–Tyr899 FWf3 (GenBank: ANW96115.1) или область Ala33–Val730 FWf4 (GenBank: ANW96116.1), были получены методом безрестрикционного клонирования (RF) [222]. В качестве матрицы для амплификации генов фукоиданаз использовали геномную ДНК *W. fucanilytica* CZ1127^T. Дизайн праймеров (Таблица 7) и подбор условий полимеразной цепной реакции (ПЦР) были выполнены с использованием сервера <http://www.rf-cloning.org/>. Получение рекомбинантных плазмид, содержащих вставки генов, кодирующих усеченные производные фукоиданаз, проводили в 2 раунда ПЦР. Полученные после 1-го раунда ПЦР «мегапраймеры» использовали в качестве затравки, плазмиду pet-22b(+) («Novagen», США) – в качестве матрицы для получения рекомбинантных плазмид, содержащих целевые вставки фукоиданаз, pet-22b/*fwf1*, pet-22b/*fwf2*, pet-22b/*fwf3* и pet-22b/*fwf4*. После RF-клонирования материнскую плазмиду pet-22b(+) удаляли путем расщепления рестриктазой DpnI (1 мкл 20 ед/л в течение 2 ч при 37 °С). Продукты ПЦР выделяли при помощи набора для выделения плазмидной ДНК («Евроген», Россия) согласно рекомендациям производителя.

Таблица 7 – Последовательности олигонуклеотидов, использованных для получения рекомбинантных фукоиданаз FWF1–4

Название праймеров	Последовательность, направление от 5'-конца к 3'-концу
FWf1: прямой (0)	<u>ААТТТТГТТТААСТТТААГААГГАГАТАТАСАТАТГАТСТТААТАААТС</u> АТАТТГААГСТСАААГААТГ

Название праймеров	Последовательность, направление от 5'-конца к 3'-концу
обратный (I)	<u>CTTGTCGACGGAGCTCGAATT</u> AGGCCATAACACAACGGAT
FWf2: прямой (0)	<u>ATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAGGTTTATTATAA</u> TGAATTTGATACTTATAGT
обратный (I)	<u>CTTGTCGACGGAGCTCGAATTTT</u> TTAGTATGATTTTATGATGTTTATTTAA TACTAG
FWf3: прямой (0)	<u>AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTAAGCAACATAA</u> TTCAGGCTCAAGTA
обратный (I)	<u>CTTGTCGACGGAGCTCGAATT</u> ATATACCTTAAAAGTTTGATTTTTTTCT GATGC
FWf4: прямой (0)	<u>AATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTTTAAATCCAG</u> AGCAGGGGCT
обратный (I)	<u>CTTGTCGACGGAGCTCGAATT</u> ACCTTAAAACCTTGTTTTTTTTCTGATA STATGG

Примечание: подчеркнутые последовательности являются вектор-специфичными участками праймера; неподчеркнутые – ген-специфичными участками праймера

Компетентные клетки XL10-Gold были трансформированы полученными продуктами ПЦР методом «теплового шока» согласно рекомендациям производителя. Рекомбинантные плазмиды *pet-22b/fwf1*, *pet-22b/fwf2*, *pet-22b/fwf3* и *pet-22b/fwf4* были выделены с помощью набора Plasmid Miniprep фирмы «Евроген» (Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей было выполнено по методу Сэнгера коммерческой фирмой «Евроген» (Россия).

3.4.3 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Анализ продуктов ПЦР и рекомбинантных плазмид проводили в 1%-ном агарозном геле в 50 мМ трис-ацетатном буфере pH 8,0. В качестве стандарта использовали маркер длин ДНК «1 kb DNA ladder, reqGOLD» 250-10000 п. о. («VWR International», США) («Bio-rad», США). Окрашивание геля проводили 0,01%-ным раствором этидиумбромидом в 50 мМ трис-ацетатном буфере pH 8,0. Нуклеиновые кислоты, окрашенные этидиумбромидом, регистрировали в геле при помощи системы для гель-документирования фирмы «Helicon» (Россия) при длине волны 365 нм.

3.4.4 Оптимизация экспрессии рекомбинантных фукоиданаз в штаммах *E. coli*

Трансформацию штаммов бактерий *E. coli* Arctic Express (DE3), BL21 Gold (DE3)pLysS, BL21 Codon Plus (DE3) RIPL или BL21 star (DE3)pLysS рекомбинантными плазмидами *pet-22b/fwf1*, *pet-22b/fwf2*, *pet-22b/fwf3* или *pet-22b/fwf4* проводили методом теплового шока. Отбор колоний, содержащих целевые плазмиды, осуществляли на агарсодержащей питательной среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Культивирование отобранных колоний проводили в 3 мл питательной среды LB pH 7,2, содержащей 100 мкг/мл (конечная концентрация) ампициллина, в течении 18 ч при 37 °C и 210 об/мин. Полученные суспензии

культур трансгенных клеток инокулировали (1:100 об./об.) в колбы объемом 500 мл с 100 мл питательной среды LB pH 7,2 или среды для автоиндукции ZYP5052 (содержащей глюкозу и лактозу в качестве индуктора экспрессии генов) [223], с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. Культивирование вели при 31 °С, 180 об/мин до достижения оптической плотности суспензии клеток $OP_{600} = 0,4$. Затем температуру понижали до 18 °С и, в случае наращивания бактерий в LB, индуцировали экспрессию генов добавлением 0,4 или 0,8 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), культивирование продолжали при 18 °С, 180 об/мин в течение 24 ч. В питательной среде для автоиндукции экспрессии рекомбинантных белков ZYP5052 бактерии выращивали при 180 об/мин и 18 °С до достижения насыщения плотности культур (в течение 24–48 ч) без добавления ИПТГ. Полученные культуры клеток центрифугировали при 6000 об/мин и 4 °С в течение 30 мин. Питательную среду (супернатант) отбрасывали, осадки трансгенных штаммов взвешивали, суспендировали в 0,04 М трис-НСl буфере pH 7,2 в соотношении 1:5 (масса/об.) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonopuls HD 2070 («Bandelin electronic», Германия) (20 кГц, 10 раз по 5 мин, на льду). Клеточный дебрис отделяли от экстрактов центрифугированием при 10000 об/мин и температуре 4 °С в течение 30 мин. Оценку уровня экспрессии и чистоты целевых белков проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [210].

3.4.5 Получение рекомбинантных фукоиданаз

Экспрессию рекомбинантных фукоиданаз проводили с использованием штамма *E. coli* Arctic Express (DE3). Трансгенные штаммы, трансформированные рекомбинантными плазмидами *pet-22b/fwf1*, *pet-22b/fwf2*, *pet-22b/fwf3* и *pet-22b/fwf4*, культивировали в 3 мл питательной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина в течении 18 ч при 37 °С, 210 об/мин. Полученную суспензию культуры трансгенных клеток (1 мл) инокулировали в 100 мл питательной среды LB (в колбу объемом 500 мл), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и наращивали при 31 °С и 180 об/мин до достижения оптической плотности суспензии клеток $OP_{600} = 0,4$. Затем понижали температуру до 18 °С и добавляли индуктор для экспрессии целевых генов – ИПТГ (конечная концентрация 0,4 мМ). После индуцирования экспрессии трансгенные клетки бактерий культивировали в течение 24 ч.

3.4.6 Выделение и очистка рекомбинантных фукоиданаз

Все этапы выделения и очистки рекомбинантных ферментов проводили на льду. Культуры трансформированных клеток *E. coli* центрифугировали при 6000 об/мин и 4 °С в течение 30 мин для отделения от жидкой питательной среды. Полученные бактериальные клетки взвешивали, суспендировали в 0,04 М трис-НСl буфере (с добавлением 0,2 М NaCl и 10

мМ имидазола) рН 7,2 в соотношении 1:5 (масса/об.) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Sonopuls HD 2070 («Bandelin electronic», Германия) (20 кГц, 10 раз по 5 мин, на льду). Нерастворимую часть клеточного лизата отделяли от экстрактов центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 мин, после чего полученные экстракты подвергали Ni-аффинной хроматографии на картридже HisTrap HP («GE Healthcare», США), уравновешенном 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,2, который содержал 0,3 М NaCl и 10 мМ имидазола (конечные концентрации). Белки с полигистидиновой последовательностью были элюированы 0,05 М трис-НСl буфером рН 7,2, который содержал 0,3 М NaCl и 300 мМ имидазола со скоростью потока 1 мл/мин. Содержание белка во фракциях оценивали с помощью метода Брэдфорда [208]. Фракции, содержащие белок, объединяли и концентрировали до 1 мл ультрафильтрацией на мембране Amicon® Ultra 15 mL Filters («Millipore», США) с пределом отсечения 50 кДа. Препараты ферментов обессоливали на картридже для гельпроникающей хроматографии HiTrap™ Desalting (5 мл) («GE Healthcare», США), уравновешенном 0,04 М трис-НСl буфером рН 7,2. Элюирование вели тем же буфером со скоростью 1 мл/мин. Полученные препараты ферментов замораживали и хранили при -20 °С.

3.4.7 Определение активности фукоиданаз

Активность рекомбинантных фукоиданаз определяли с помощью электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ-электрофореза). Активность фукоиданаз регистрировали по появлению полос заряженных олигосахаридов в геле. Реакционная смесь, содержащая 5 мкл раствора фермента (0,01–0,1 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl буфере рН 7,2 с 5 мМ CaCl₂ и 5 мкл водного раствора фукоидана (20 мг/мл) или раствора сульфатированного олигосахариды (1 мг/мл) в воде инкубировали при 34 °С в течение 30 мин – 24 ч. Реакцию останавливали нагреванием при 90 °С в течение 5 мин. В полученные продукты гидролиза добавляли 2 мкл буфера для нанесения образцов, содержащего 40%-ный раствор глицерина в воде и 0,02% фенолового красного. Аликвоты образцов (6 мкл) наносили на пластинку полимеризованного 20%-го геля и подвергали электрофорезу при 20 мА в течение 40–50 мин. Гель был приготовлен растворением в 25 мл 0,1 М трис-боратного буфера рН 8,3, акриламида и бисакриламида с соотношением 19 к 1, с добавлением 120 мкл ПСА (100 мг/мл) и 10 мкл ТЕМЕД. Размер пластинки полиакриламидного геля 140×140×1 мм. Окрашивание геля проводили 0,03%-ным раствором альцианового синего 8 GX в 2%-ной уксусной кислоте и/или 0,02%-ным раствором О-толуидинового синего в течение 1 ч при комнатной температуре (24–25 °С). После окрашивания гель отмывали дистиллированной водой до исчезновения синего фона красителя (но не более 2 ч).

3.5 Характеристика биохимических свойств фукоиданаз

3.5.1 Определение влияния ионов мультивалентных металлов на активность фукоиданаз

Для определения влияния ионов металлов на активность фукоиданаз реакционные смеси, содержащие 9 мкл раствора FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,01 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl буфере рН 7,2, 9 мкл водного раствора фукоидана из *F. evanescens* (20 мг/мл) и раствор (2 мкл 0,05 М) соответствующей соли (AlCl_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , MgCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 , NiSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ или SnCl_2) инкубировали в течение 1 ч при 34 °С. Эксперимент по определению ионов металлов, оказывающих ингибирующее действие на активность ферментов, проводили аналогичным образом, предварительно проинкубировав фукоиданазы с 5 мМ CaCl_2 (конечная концентрация в реакционной смеси) в течении 5 мин при комнатной температуре (24–25 °С). Реакции останавливали замораживанием. Уровень активности ферментов регистрировали с помощью ПААГ-электрофореза (см. раздел 3.4.7).

Для определения влияния различных концентраций CaCl_2 и NaCl на активность фукоиданаз реакционные смеси, содержащие 8 мкл раствора FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,01 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl буфере рН 7,2, 8 мкл водного раствора фукоидана из *F. evanescens* (20 мг/мл) и 4 мкл водного раствора CaCl_2 или NaCl с различными концентрациями (0,025 М, 0,05 М, 0,25 М, 0,5 М, 1 М, 1,75 М, 2,5 М или 5 М) инкубировали в течение 1 ч при 34 °С. Реакции останавливали замораживанием. Уровень активности ферментов регистрировали с помощью ПААГ-электрофореза (см. раздел 3.4.7).

3.5.2 Определение рН оптимума активности фукоиданаз

Реакционные смеси, содержащие 10 мкл раствора FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,01 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl буфере рН 7,2 с 5 мМ CaCl_2 , 5 мкл буферов с различными значениями рН (использовались 0,3 М цитратные буферы с диапазоном рН 4,0–6,5, 0,2 М трис-НСl буферы с диапазоном рН 6,5–8,5 или 0,2 М боратный буфер с рН 9,0) и 5 мкл водного раствора фукоидана из *F. evanescens* (40 мг/мл), инкубировали в течение 1 ч при 34 °С. Реакцию останавливали замораживанием. Уровень активности ферментов регистрировали с помощью ПААГ-электрофореза (см. раздел 3.4.7).

3.5.3 Определение температурного оптимума активности фукоиданаз

Реакционные смеси, содержащие 10 мкл раствора FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,01 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl буфере рН 7,0 и 5 мМ CaCl_2 , инкубировали с 10 мкл водного раствора

фукоидана (20 мг/мл) при различных температурах в диапазоне от 4 до 70 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали нагреванием при 90 °С в течение 5 мин. Уровень активности ферментов регистрировали с помощью ПААГ-электрофореза (см. раздел 3.4.7).

3.5.4 Кинетика ферментативного гидролиза фукоидана

Кинетику ферментативного гидролиза фукоидана оценивали с помощью ПААГ-электрофореза. Реакционную смесь, содержащую 100 мкл раствора FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,01 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl-буфере, рН 7,2, с 5 мМ CaCl₂ и 100 мкл водного раствора фукоидана (20 мг/мл), инкубировали при 34 °С. Аликвоты (10 мкл) из реакционной смеси отбирали через 5, 10, 15, 25, 40 мин и 1, 4 и 24 ч. Реакцию останавливали нагреванием при 90 °С в течение 5 мин. Для анализа ферментативной деполимеризации фукоидана при различном времени инкубирования использовали ПААГ-электрофорез (см. раздел 3.4.7).

3.6 Определение субстратной специфичности фукоиданаз

3.6.1 Получение 4-О-десульфатированных производных фукоиданов

Для увеличения разнообразия фукоиданов с различными схемами сульфатирования были получены их 4-О-десульфатированные производные. Фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* и его высокомолекулярное производное НМР, полученное с помощью эндофукоиданазы FFA2 [52] были 4-О-десульфатированы с помощью эндо-сульфатазы SWF5 [177]. Реакцию, содержащую 40 мкл водного раствора фукоидана или его высокомолекулярного производного (10 мг/мл) и 40 мкл раствора SWF5 (0,1 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl-буфере рН 7,0, с добавлением 5 мМ CaCl₂ и 0,2 М NaCl, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Реакцию останавливали нагреванием при 90 °С в течение 5 мин. Денатурированный белок отделяли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 мин, супернатант, содержащий 4-О-десульфатированные производные, высушивали на вакуумном центробежном концентраторе CentriVar («Labconco», США). Полученные производные перерастворяли в 20 мкл воды и добавляли 20 мкл раствора FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,01 мг/мл) в 0,04 М трис-НСl-буфере рН 7,2 с добавлением 5 мМ CaCl₂. Реакционную смесь инкубировали 24 ч при 34 °С, реакцию останавливали нагреванием при 90 °С в течение 5 мин. Активность фукоиданаз оценивали с помощью ПААГ-электрофореза (см. раздел 3.4.7).

3.6.2 Получение и выделение продуктов ферментативного гидролиза фукоидана

Фукоидан FeF из *F. evanescens* (0,5 г) растворяли в 45 мл 0,04 М трис-НСl буфера рН 7,0, с добавлением 5 мМ CaCl₂, 0,001% NaN₃ и 2 мл FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 (0,1 мг/мл). Фукоидан из *A. angusta* (0,4 г) растворяли в 35 мл 0,04 М трис-НСl буфера рН 7,0 с добавлением

5 мМ CaCl₂, 0,01% NaN₃ и 2 мл FWf1 (0,1 мг/мл). Реакционные смеси инкубировали при 34 °С в течение 72 ч, затем депротеинизировали нагреванием при 90 °С в течение 10 мин, осадок белков удаляли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 20 мин. Высокомолекулярные продукты реакции (ВМП) осаждали этанолом в соотношении 1:3 (об./об.), осадок отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 40 мин. Супернатант, содержащий низкомолекулярные продукты реакции (НМП), упаривали на роторном испарителе Heidolph («Heidolph Instruments», Германия) для удаления спирта и затем разбавляли дистиллированной водой до 1 л. Разделение олигосахаридов проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке Q-Sepharose HP (1,5×10 см) («GE Healthcare», США), уравновешенную водой. Для сбора фракций использовали перистальтический насос EP-1 Econo pump с коллектором фракций («Bio-Rad», США). Олигосахариды, полученные из фукоидана FeF с помощью фукоиданазы FWf1, элюировали линейным градиентом концентраций 0,5–2 М NH₄HCO₃ (80×80 мл). Олигосахариды, полученные с помощью фукоиданазы FWf2, элюировали линейным градиентом концентраций 0–2 М NH₄HCO₃ (80×80 мл). Продукты, полученные с помощью FWf3, элюировали двумя ступенями линейного градиента концентраций NH₄HCO₃ (1–2 М и 1,5–2,5 М) и двумя ступенями линейного градиента концентраций NaCl (0–1 М и 0,5–1,5 М), объем на одну ступень градиента концентраций 80×80 мл. Продукты, полученные с помощью FWf4, элюировали четырьмя ступенями линейного градиента концентраций NH₄HCO₃ (0,25–0,75 М, 0,5–1 М, 1–1,5 М и 1,5–2 М), объем на одну ступень градиента концентраций 80×80 мл. Продукты гидролиза фукоидана из *A. angusta*, полученные с помощью FWf1, были элюированы двумя ступенями линейного градиента концентраций NH₄HCO₃ (0–1 М и 0,5–1,5 М), объем на одну ступень градиента концентраций 80×80 мл. Объем собираемых фракций 1 мл, скорость потока 1 мл/мин. Содержание углеводов во фракциях определяли фенол-серноокислотным методом [206]. Фракции, содержащие углеводы, дополнительно анализировали с помощью ПААГ-электрофореза (см. раздел 3.4.7) для выявления гомогенных продуктов ферментативного гидролиза. Фракции олигосахаридов, демонстрирующие только одну полосу на электрофореграмме, объединяли, обессоливали на роторном испарителе Heidolph («Heidolph Instruments», Германия) или с помощью гельпроникающей хроматографии на картридже «HiTrap™ Desalting». Все полученные фракции высоко- и низкомолекулярных продуктов гидролиза упаривали на роторном испарителе досуха и растворяли в 1 мл дистиллированной воды, после чего лиофилизировали. Выходы полученных олигосахаридов рассчитывались в процентах относительно навески исходного фукоидана, взятого в реакционную смесь. Структуры полученных высокомолекулярных фракций и олигосахаридов определяли с помощью ЯМР-спектроскопии.

3.6.3 Получение 2-АВ-меченных олигосахаридов

Мечение сульфатированных фукоолигосахаридов 2-аминобензамидом (2-АВ) проводили как описано в [224] с некоторыми изменениями. 0,3 М 2-АВ растворяли в смеси диметилсульфоксида (ДМСО) и 15%-ной ледяной уксусной кислоты, содержащей 1 М NaCNBH_3 . К 500 нМ чистых олигосахаридов добавляли 1 мл приготовленной реакционной смеси 2-АВ и инкубировали в течение 8 ч при 37 °С. Меченые олигосахариды отделяли от восстановителя и избытка 2-АВ с помощью анионообменной хроматографии на колонке Q-Sepharose HP (0,5×1 см) с одноступенчатым градиентом концентраций NH_4HCO_3 (от 2 М до 2,5 М). Элюированные олигосахариды дополнительно обессоливали и концентрировали с помощью вакуумного испарителя. Отделение 2-АВ-меченых олигосахаридов от непрореагировавших проводили методом ПААГ-электрофореза (раздел 3.4.7). После электрофореза акриламидный гель помещали в трансиллюминатор (365 нм) и вырезали флуоресцентные полосы олигосахаридов. Кусочки акриламидного геля, содержащие меченые 2-АВ олигосахариды, гомогенизировали пестиком и экстрагировали водой. Полученные образцы флуоресцентно меченых олигосахаридов концентрировали с помощью вакуумного испарителя и лиофильно высушивали.

3.6.4 Определение молекулярной массы фукоиданов и их ферментативных производных

Молекулярные массы образцов полисахаридов определяли методом гелепроникающей хроматографии с использованием ВЭЖХ-прибора Agilent 1100 Series («Agilent», Германия), оснащенного рефрактометрическим детектором и последовательно соединенными колонками Shodex OHpak SB-805 HQ и OHpak SB-803 HQ («Showa Denko», Япония). Элюирование проводили 0,15 М водным раствором NaCl при 40 °С со скоростью потока 0,4 мл/мин. Молекулярную массу (M_w), среднечисловую молекулярную массу (M_n), молекулярную массу, соответствующую максимуму хроматографического пика (M_p), и индекс полидисперсности (PDI) фукоиданов и их производных оценивали с использованием стандартных декстранов 5, 10, 25, 50, 80, 250, 410 и 670 кДа («Sigma-Aldrich», Германия) в качестве эталонных стандартов.

3.6.5 Определение степени полимеризации олигосахаридов в низкомолекулярных производных фукоидана

Гельпроникающая хроматография. Степень полимеризации (СП) олигосахаридов во фракциях низкомолекулярных продуктов гидролиза (НМП) оценивали методом гелепроникающей хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1100 Series («Agilent», Германия), оснащенного хроматографической колонкой (15×500 мм), заполненной носителем Superdex 30 («GE Healthcare Bio -Science», Швеция). Элюирование олигосахаридов

проводили 0,2 М раствором NH_4HCO_3 при комнатной температуре (24–25 °С) со скоростью потока 0,4 мл/мин. Распределение СП сульфатированных фукоолигосахаридов во фракциях НМП оценивали с использованием 2-О-сульфатированных тетра-, гекса-, окта- и дека-фукоолигосахаридов (4F2S(4S), 6F2S(6S), 8F2S(8S) и 10F2S(10S)) в качестве стандартов.

Масс-спектрометрия. Запись, анализ и расшифровку масс-спектров проводил сотрудник Лаборатории физико-химических методов исследования ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Анастюк С. Д.

Масс-спектрометрические исследования олигосахаридов были проведены с помощью квадрупольно-времяпролетного хроматомасс-спектрометра высокого разрешения Agilent 6520 («Agilent», США) с ионизацией электрораспылением (ИЭР-МС). Масс-спектры получены при напряжении иглы в 4 кВ в отрицательном и 3.5 кВ в положительном режимах регистрации при температуре осушающего газа 325 °С и напряжении фрагментатора 243 В. Пробоподготовка: сухой образец разбавляли в смеси ацетонитрил/вода (1:1) до получения концентрации ~0,01 мг/мл и вводили полученный раствор с помощью шприцевого насоса (KD Scientific, США) со скоростью потока 5 мкл/мин. Калибровку проводили с помощью стандартной калибровочной смеси «HP MIX». В тандемном режиме энергия столкновительной диссоциации выбиралась из промежутка 10–30 В по интенсивности фрагментных ионов. В качестве столкновительного газа применялся аргон. Обработка спектров и преобразование из множественно-заряженных ионов в однозарядные производились с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.05.00 фирмы «Agilent».

3.6.6 ЯМР-спектроскопия

Запись, анализ и расшифровку спектров ЯМР проводили сотрудники лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Расин А.Б. и к.х.н. Усольцева Р.В., а также сотрудники лаборатории физико-химических методов исследования ТИБОХ ДВО РАН, д.х.н. Калиновский А.И. и к.х.н. Исаков В.В.

Спектры ЯМР были получены с использованием одно- (^1H , ^{13}C , TOCSY) и двумерных методик (COSY, ROESY, HSQC, TOCSY) на ЯМР-спектрометре Avance III-700 («Bruker Biospin AG», Швейцария) и спектрометре Avance II-500 HD («Bruker», Германия). Навеску поли- или олигосахариды растворяли в 550 мкл D_2O , добавляли 2 мкл ацетона в качестве внутреннего стандарта (2,225 м. д.) и переносили в ампулу (5 мм) для ЯМР-спектроскопии. Ампулу с образцом вставляли в магнит и давали ей достичь теплового равновесия перед проведением эксперимента. Эксперименты проводили при температуре 35 °С.

3.7 Методы исследования *in vitro* биологической активности

3.7.1 Культивирование клеток

Эпидермальные клетки мыши JB6 C141 и клетки аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 культивировали в питательной среде MEM, содержащей 5% или 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS). Клетки меланомы SK-MEL-28, клетки фиброаденомы молочной железы MCF7 и аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 человека культивировали в DMEM, содержащей 10% FBS. Клетки аденокарциномы толстого кишечника человека DLD-1 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS. Перед добавлением в питательные среды FBS была инактивирована нагреванием. Все питательные среды содержали также 200 мМ L-глутамин, 100 ед/л пенициллина и 100 мкг/л стрептомицина. Культивирование клеточных линий проводили в инкубаторе MCO-18AIC («SANYO», Япония) при температуре 37 °С и 5% CO₂ до образования монослоя.

3.7.2 Определение цитотоксического эффекта FeF и продуктов его гидролиза

Клетки JB6 C141, HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1, MCF7 и MDA-MB-231 рассеивали (6×10^3 /мл) в 96-луночные планшеты в 200 мкл соответствующей питательной среды и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂. Затем среду удаляли и заменяли свежей средой, содержащей: а) PBS (контроль); б) исследуемые образцы (FeF, ВМП_FWf1–4, НМП_FWf1–4, 1AaF2 или ВМП_1AaF2) с различной концентрацией (200, 400 или 800 мкг/мл для FeF и его производных; 50, 100, 200, 400 или 800 мкг/мл для 1AaF2 и ВМП_1AaF2). Культуральную среду удаляли с помощью медицинского отсасывателя OM-1 («Утес», Россия) и двукратно промывали каждую лунку 100 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS). Монослой клеток обрабатывали 50 мкл трипсина и инкубировали в течение 5 мин, после чего добавляли по 150 мкл соответствующей культуральной среды и тщательно суспендировали. Количество клеток подсчитывали с помощью гемоцитометра под микроскопом Motic AE 20 («Motic», Китай).

3.7.3 Изучение действия фукоиданов и их производных на самопроизвольное формирование и рост колоний клеток рака

Действие фукоиданов и их производных на самопроизвольное формирование и рост колоний раковых клеток определяли с помощью метода мягких агаров [187]. Клетки HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1, MCF7 и MDA-MB-231 ($2,4 \times 10^4$ /мл) обрабатывали фукоиданом из бурой водоросли *F. evanescens* (FeF) или продуктами его ферментативного гидролиза (ВМП_FWf1–4, НМП_FWf1–4) в концентрации 200 мкг/мл. Клетки SK-MEL-28 обрабатывали фукоиданом из бурой водоросли *A. angusta* (1AaF2) или его высокомолекулярным производным (ВМП_1AaF2)

в концентрациях 50, 100, 200 или 400 мкг/мл. Рост клеток происходил в 1 мл 0,33% ВМЕ агара, содержащего 10% FBS, наслоенного поверх 0,5%-го ВМЕ агара, содержащего соответствующую концентрацию фукоидана или его производного. Культуру выдерживали в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 2 недель при 37 °С, клеточные колонии подсчитывали с использованием инвертированного микроскопа Motic AE 20 («Motic», Китай) и программного обеспечения ImageJ («National Institutes of Health», США). Снимки клеточных колоний в агаре получали с помощью программы Motic Image Plus («Motic», Китай).

3.7.4 Изучение действия фукоиданов и их производных *in vitro* на формирование и рост колоний клеток, индуцированные EGF

Действие фукоиданов и их производных *in vitro* на неопластическую трансформацию нормальных клеток или формирование и рост колоний раковых клеток, индуцированные эпидермальным фактором роста (EGF), оценивали с помощью метода мягких агаров. Подбор концентрации EGF (среди 10, 20 и 40 нг) был произведен на клетках JB6 C141 с помощью метода мягких агаров [187]. Клетки JB6 C141, HuTu 80, SK-MEL-28 и DLD-1 ($2,4 \times 10^4$ /мл) обрабатывали 20 нг EGF и фукоиданом из бурой водоросли *F. evanescens* (FeF) или продуктами его ферментативного гидролиза (ВМП_FWf1-4, НМП_FWf1-4) в концентрации 200 мкг/мл. Клетки JB6 C141 обрабатывали 20 нг EGF и фукоиданом из бурой водоросли *A. angusta* (1AaF2) или его высокомолекулярным производным (ВМП_1AaF2) в концентрациях 50, 100 и 200 мкг/мл. Клетки SK-MEL-28 обрабатывали 20 нг EGF и 1AaF2 или ВМП_1AaF2 в концентрациях 50, 100, 200 и 400 мкг/мл. Рост клеток происходил в 1 мл 0,33%-го ВМЕ агара, наслоенного поверх 0,5%-го ВМЕ агара. Агары содержали соответствующую концентрацию EGF, или фукоидана, или его производного, или EGF в сочетании с фукоиданом или его производным. Контрольные клетки росли в агарах без добавления EGF или фукоидана или его производного. Культуру выдерживали в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 2 недель при 37 °С. Клеточные колонии подсчитывали с использованием инвертированного микроскопа Motic AE 20 («Motic», Китай) и программного обеспечения ImageJ («National Institutes of Health», США). Снимки клеточных колоний в агаре получали с помощью программы Motic Image Plus («Motic», Китай).

3.7.5 Статистический анализ данных

Каждое представленное в данном исследовании значение является средним значением как минимум трех независимых экспериментов с аналогичными результатами. Статистические различия оценивали с использованием одностороннего дисперсионного анализа (one-way ANOVA) [225] и Tukey's HSD теста, где * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/).

ВЫВОДЫ

1. Штамм морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T является продуцентом как минимум четырех фукоиданаз GH107, названных нами как FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4.
2. Фукоиданазы FWf1–4 имеют мультидоменную организацию. Помимо каталитического домена исследуемые ферменты содержат по 3-4 дополнительных домена. Состав и количество этих доменов в фукоиданазах семейства GH107 различается. Состав и расположение некоторых остатков аминокислот в активных центрах фукоиданаз FWf1–4 варьируется. Эти переменные аминокислотные остатки могут отвечать за связывание в их активных центрах фрагментов фукоидана различной структуры.
3. Рекombинантные фукоиданазы имели отличия в оптимумах pH и температур. Соли различных металлов оказывали как активирующий, так и ингибирующий эффекты на ферментативную активность фукоиданаз FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4.
4. Специфичность исследуемых фукоиданаз к различным структурам в фукоиданах обусловлена топологией их углеводсвязывающих подсайтов, количество и селективность которых различается. Рекombинантные фукоиданазы FWf1–4 катализируют гидролиз 1→4-гликозидных связей в фукоиданах, построенных преимущественно из 1→3; 1→4-связанных остатков сульфатированной α -L-фукозы. На основании анализа специфичности и типа действия исследуемые фукоиданазы классифицированы нами как эндо- α -1→4-L-фукоиданазы (шифр КФ 3.2.1.212).
5. Молекулярная масса, степень сульфатирования и расположение сульфатных групп являются важными элементами в противоопухолевых эффектах, проявляемых фукоиданом из *F. evanescens in vitro*. Важность вышеописанных структурных элементов переменна для различных типов раковых клеток.
6. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *F. evanescens*, и его ферментативные производные проявляют селективность противоопухолевого действия по отношению к разным типам опухолевых клеток.
7. Фукоиданы из *F. evanescens* и *A. angusta*, а также их ферментативные производные обладают канцеропреентивной активностью: ингибируют индуцированные EGF формирование и рост колоний нормальных и раковых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фукоиданы обладают множеством биологических активностей, однако детали структуры, ответственные за проявляемые ими биологические эффекты, сложно установить. Для решения данной проблемы необходимы методы тонкого редактирования определенных элементов структур, входящих в их состав. Считается, что биологическое действие фукоиданов может различаться в зависимости от моносахаридного состава, степени сульфатирования, расположения сульфатных групп, наличия/отсутствия боковых ответвлений, молекулярной массы и других факторов. Ферменты с установленным механизмом действия и субстратной специфичностью могут являться эффективными инструментами для направленного редактирования структур углеводов. Однако ферменты, действующие на фукоиданы, слабо изучены.

Данная работа посвящена изучению четырех фукоиданаз (FWf1–4) 107 структурного семейства гликозидгидролаз (GH107) морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. С помощью современных методов биоинформатики было получено представление о доменной организации полипептидных цепей исследуемых ферментов и различиях в их каталитических центрах. Для фукоиданаз FWf1–4 были определены оптимальные условия для проявления их каталитической активности, установлены детальная специфичность и топология углеводсвязывающих подсайтов. Показано, что специфичность фукоиданаз семейства GH107 может различаться в отношении не только типа гликозидной связи, но и расположения сульфатных групп при остатках α -L-фукозы, находящихся в непосредственной близости от места расщепления. Полученные данные впервые демонстрируют, что фукоиданазы семейства GH107 имеют комплексную специфичность и могут содержать различное количество углеводсвязывающих подсайтов, распознающих остатки α -L-фукозы с определенным сульфатированием в молекулах фукоиданов. Ферменты FWf1–4 были классифицированы нами как эндо-1,4- α -L-фукоиданазы (КФ 3.2.1.212).

Были продемонстрированы возможности применения исследованных фукоиданаз семейства GH107 для направленного редактирования структуры фукоидана из *F. evanescens*. Различная специфичность фукоиданаз к расщеплению гликозидных связей внутри фрагментов фукоиданов с определенными схемами сульфатирования позволила получить восемь производных фукоидана, различающихся молекулярной массой и расположением сульфатных групп при остатках α -L-фукозы. Такие производные могут быть полезны для достоверного выявления взаимосвязи между структурой фукоиданов и их биологическим действием.

В рамках данной работы впервые было проведено комплексное исследование противоопухолевой активности большого набора структурно различающихся продуктов

ферментативного гидролиза фукоиданов. Это позволило выявить некоторые элементы структур фукоиданов, обуславливающие наблюдаемые противораковые эффекты. Показано, что молекулярная масса, количество и расположение сульфатных групп являются важными элементами в противораковых эффектах, проявляемых фукоиданами *in vitro*. Однако важность вышеописанных структурных элементов оказалась различной для различных типов раковых клеток. С помощью исследованных ферментов были получены производные фукоидана, которые значительно превосходят противораковый эффект исходного фукоидана. Кроме того, некоторые производные продемонстрировали высокую избирательность действия по отношению к определенным типам раковых клеток.

Исследование канцеропреventивной активности фукоиданов и их ферментативных производных впервые показало, что важность определенных структурных элементов фукоиданов, ответственных за их усиленное противораковое действие, может различаться не только по отношению к различным типам раковых клеток, но и зависеть от определенных экзогенных факторов, воздействующих на раковые клетки.

С помощью одной из исследуемых фукоиданаз были установлены основные структурные фрагменты галактофукана из бурой водоросли *A. angusta*, что хорошо демонстрирует перспективы применения фукоиданаз в качестве молекулярных инструментов для установления сложных структур фукоиданов.

Полученные результаты представляют новые знания о функционировании ферментов семейства GH107 и демонстрируют перспективность применения данных ферментов как для определения сложных структур фукоиданов, так и для получения их структурных производных с улучшенными биологическими свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robinson, P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications / P.K. Robinson // Essays in Biochemistry. – 2015. – Vol. 59. – P. 1.
2. Schaefer, R.M. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: A systematic review of available evidence / R.M. Schaefer, A. Tyłki-Szymańska, M.J. Hilz // Drugs. – 2009. – Vol. 69. – № 16. – P. 2179–2205.
3. Kishnani, P.S. New therapeutic approaches for Pompe disease: Enzyme replacement therapy and beyond / P.S. Kishnani, A.A. Beckemeyer // *Pediatr Endocrinol Rev.* – 2014. – Vol. 1. – P. 114–124.
4. Adrio, J.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes / J.L. Adrio, A.L. Demain // *Biomolecules.* – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 117–139.
5. Antonio Trincone, I.D. Marine glycosyl hydrolases as tool for industrial application. *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases* / I.D. Antonio Trincone. – Netherlands. : Springer, 2020. – 151–166 pp.
6. Pradhan, B. Multifunctional role of fucoidan, sulfated polysaccharides in human health and disease: A journey under the sea in pursuit of potent therapeutic agents / B. Pradhan, S. Patra, R. Nayak, C. Behera, S.R. Dash, S. Nayak, B.B. Sahu, S.K. Bhutia, M. Jena // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020. – Vol. 164. – P. 4263–4278.
7. Wang, Y. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: a review of recent studies / Y. Wang, M. Xing, Q. Cao, A. Ji, H. Liang, S. Song // *Marine Drugs.* – 2019. – Vol. 17. – № 3. – P. 183.
8. Wang, H. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 / H. Wang, M. Naghavi, C. Allen, R.M. Barber, Z.A. Bhutta, A. Carter, M.L. Bell // *The Lancet.* – 2016. – Vol. 388. – № 10053. – P. 1459.
9. Anand, U. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics / U. Anand, A. Dey, A.K.S. Chandel, R. Sanyal, A. Mishra, D.K. Pandey, J.M.P. de la Lastra // *Genes & Diseases.* – 2023. – Vol. 10. – № 4. – P. 1367–1401.

10. Bittkau, K.S. Comparison of the effects of fucoidans on the cell viability of tumor and non-tumor cell lines / K.S. Bittkau, P. Dörschmann, M. Blümel, D. Tasdemir, J. Roeder, A. Klettner, S. Alban // *Marine drugs*. – 2019. – Vol. 17. – №. 8. – P. 441.
11. Coombe, D.R. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulphated polysaccharides / D.R. Coombe, C.R. Parish, I.A. Ramshaw, J. M. Snowden // *International Journal of Cancer*. – 1987. – Vol. 39. – №. 1. – P. 82–88.
12. Alekseyenko, T.V. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga / T.V. Alekseyenko, S.Y. Zhanayeva, A.A. Venediktova, T.N. Zvyagintseva, T.A. Kuznetsova, N.N. Besednova, T.A. Korolenko // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2007. – Vol. 143. – P. 730–732.
13. Aisa, Y. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways / Y. Aisa, Y. Miyakawa, T. Nakazato, H. Shibata, K. Saito, Y. Ikeda, M. Kizaki // *American journal of hematology*. – 2005. – Vol. 78. – №. 1. – P. 7–14.
14. Kwon, M.J. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway / M.J. Kwon, T.J. Nam // *Cell biology international*. – 2007. – Vol. 31. – №. 8. – P. 768–775.
15. Mak, W. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities / W. Mak, N. Hamid, T. Liu, J. Lu, W.L. White // *Carbohydrate polymers*. – 2013. – Vol. 95. – №. 1. – P. 606–614.
16. Zvyagintseva, T.N. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions / T.N. Zvyagintseva, N.M. Shevchenko, A.O. Chizhov, T.N. Krupnova, E.V. Sundukova, V.V. Isakov // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 2003. – Vol. 294. – №. 1. – P. 1–13.
17. Anastyuk, S.D. Structural analysis of a highly sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* by tandem MALDI and ESI mass spectrometry / S.D. Anastyuk, N.M. Shevchenko, E.L. Nazarenko, T.I. Imbs, V.I. Gorbach, P.S. Dmitrenok, T.N. Zvyagintseva // *Carbohydrate Research*. – 2010. – Vol. 345. – №. 15. – P. 2206–2212.

18. Jin, W. Structure analysis and anti-tumor and anti-angiogenic activities of sulfated galactofucan extracted from *Sargassum thunbergii* / W. Jin, W. Wu, H. Tang, B. Wei, H. Wang, J. Sun, W. Zhong // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol. 17. – №. 1. – P. 52.
19. Gupta, D. Fucoidan inhibition of osteosarcoma cells is species and molecular weight dependent / D. Gupta, M. Silva, K. Radziun, D.C. Martinez, C.J. Hill, J. Marshall, V. Hearnden, M.A. Puetras-Mejia, G.C. Reilly // *Marine Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – №. 2. – P. 104.
20. Lee, J. Low molecular weight mannogalactofucans derived from *Undaria pinnatifida* induce apoptotic death of human prostate cancer cells in vitro and in vivo / J. Lee, S. Lee, A. Synytsya, P. Capek, C.W. Lee, J.W. Choi, S. Cho, W.J. Kim, Y.I. Park // *Marine Biotechnology*. – 2018. – Vol. 20. – P. 813–828.
21. Choi, J. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity / J. Choi, H.J. Kim // *Carbohydrate polymers*. – 2013. – Vol. 97. – №. 2. – P. 358–362.
22. Thanassi, N. M. Enzymic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone, *Haliotis* species / N.M. Thanassi, H.I. Nakada // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1967. – Vol. 118. – №. 1. – P. 172–177.
23. Kusaykin M.I. Fucoidanases / M.I. Kusaykin, A.S. Silchenko, A.M. Zakharenko, T.N. Zvyagintseva // *Glycobiology*. – 2016. – Vol. 26. – №. 1. – P. 3–12.
24. Liu, G. Characterization of an endo-1, 3-fucanase from marine bacterium *Wenylingzhuangia aestuarii*: The first member of a novel glycoside hydrolase family GH174/ G. Liu, J. Shen, Y. Chang, X. Mei, G. Chen, Y. Zhang, C. Xue // *Carbohydrate Polymers*. – 2023. – Vol. 306. – P. 120591.
25. Blake, C.C.F. Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme / C.C.F. Blake, L.N. Johnson, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips, V.R. Sarma // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. – 1967. – Vol. 167. – №. 1009. – P. 378–388.
26. Davies, G. J. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases / G.J. Davies, K.S. Wilson, B. Henrissat // *Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 321. – №. Pt 2. – P. 557.
27. Furukawa S. Purification and some properties of exo-type fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5 / S.I. Furukawa, T. Fujikawa, D. Koga, A. Ide // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 1992. – Vol. 56. – №. 11. – P. 1829–1834.
28. Sakai, T. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase / T. Sakai, T. Kawai, I. Kato // *Marine Biotechnology*. – 2004. – Vol. 6. – №. 4. – P. 335–346.

29. Ivanova, E.P. Two species of culturable bacteria associated with degradation of brown algae *Fucus evanescens* / E.P. Ivanova, I. Y. Bakunina, T. Sawabe, K. Hayashi, Y.V. Alexeeva, N.V. Zhukova, D.V. Nicolau, T.N. Zvyagintseva, V.V. Mikhailov // *Microbial ecology*. – 2002. – P. 242–249.
30. Descamps, V. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae / V. Descamps, S. Colin, M. Lahaye, M. Jam, C. Richard, P. Potin, T. Barbeyron, J.C. Yvin, B. Kloareg // *Marine Biotechnology*. – 2006. – Vol. 8. – №. 1. – P. 27–39.
31. Kusaykin, M. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds / M. Kusaykin, I. Bakunina, V. Sova, S. Ermakova, T. Kuznetsova, N. Besednova, T. Zaporozhets, T. Zvyagintseva // *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. – 2008. – Vol. 3. – №. 7. – P. 904–915.
32. Бурцева, Ю.В. Распространение фукоиданаз и некоторых гликозидаз среди морских беспозвоночных / Ю.В. Бурцева, М.И. Кусайкин, В.В. Сова, Н.М. Шевченко, С.А. Скобун, Т.Н. Звягинцева // *Биология моря*. – 2000. – Vol. 26. – № 6. – P. 429–232.
33. Sasaki K. Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2-sulfo- α -l-fucopyranose from 2-sulfo- α -l-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) pyridylaminated fucose from a sea urchin, *Strongylocentrotus nudus* / K. Sasaki, T. Sakai, K. Kojima, S. Nakayama, Y. Nakanishi, I. Kato // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 1996. – Vol. 60. – №. 4. – P. 666–668.
34. Daniel, R. Regioselective desulfation of sulfated l-fucopyranoside by a new sulfoesterase from the marine mollusk *Pecten maximus*. Application to the structural study of algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*) / R. Daniel, O. Berteau, L. Chevlot, A. Varenne, P. Gareil, N. Goasdoue // *European Journal of Biochemistry*. – 2001. – Vol. 268. – №. 21. – P. 5617–5626.
35. Kusaykin, M. I. Distribution of O-glycosylhydrolases in marine invertebrates. Enzymes of the marine mollusk *Littorina kurila* that catalyze fucoidan transformation / M.I. Kusaykin, Y.V. Burtseva, T.G. Svetasheva, V.V. Sova, T.N. Zvyagintseva // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 68. – P. 317–324.
36. Wu, Q. Purification and the secondary structure of fucoidanase from *Fusarium* sp. LD8 / Q. Wu, S. Ma, X. Hourong, M. Zhang, C. Jingmin // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2011. – Vol. 2011.

37. Rodríguez-Jasso, R.M. Fungal fucoidanase production by solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor using algal biomass as substrate / R.M. Rodríguez-Jasso, S.I. Mussatto, L. Sepúlveda, A.T. Agrasar, L. Pastrana, C.N. Aguilar, J.A. Teixeira // *Food and Bioprocess Technology*. – 2013. – Vol. 91. – №. 4. – P. 587–594.
38. Rodríguez-Jasso, R.M. Fucoidan-degrading fungal strains: screening, morphometric evaluation, and influence of medium composition / R.M. Rodríguez-Jasso, S.I. Mussatto, L. Pastrana, C.N. Aguilar, J.A. Teixeira // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2010. – Vol. 162. – P. 2177–2188.
39. Wu, Q. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94 / Q. Wu, M. Zhang, K. Wu, B. Liu, J. Cai, R. Pan // *Journal of applied phycology*. – 2011. – Vol. 23. – P. 197–203.
40. Silchenko, A.S. Endo-1, 4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing sulphated fucooligosaccharides / A.S. Silchenko, M.I. Kusaykin, A.M. Zakharenko, R.V. Menshova, H.H.N. Khanh, P.S. Dmitrenok, V.V. Isakov, T.N. Zvyagintseva // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2014. – Vol. 102. – P. 154–160.
41. Zhu, C. Overexpression and biochemical characterization of a truncated endo- α (1 \rightarrow 3)-fucoidanase from *Alteromonas* sp. SN-1009 / C. Zhu, Z. Liu, L. Ren, S. Jiao, X. Zhang, Q. Wang, Z. Li, Y. Du, J.J Li // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 353. – P. 129460.
42. Pat. USA 6489155 (B1). Enzymes capable of degrading a sulfated-fucose-containing polysaccharide and their encoding genes / M. Takayama, N. Koyama, T. Sakai, I. Kato; assignee: Takaro Shuzo CO., LTD (JP).—publ. 03.12.2002.
43. Bakunina, I.Y. et al. Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea* / I.Y. Bakunina, O.I. Nedashkovskaya, S.A. Alekseeva, E.P. Ivanova, L.A. Romanenko, N.M. Gorshkova, V.V. Isakov, T.N. Zvyagintseva, V.V. Mikhailov // *Microbiology*. – 2002. – Vol. 71. – P. 41–47.
44. Kim, W.J. Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophylls / W.J. Kim, S.M. Kim, Y.H. Lee, H.G. Kim, H.K. Kim, S.H. Moon, H.H. Suh, K.H. Jang, Y.I. Park // *Journal of microbiology and biotechnology*. – 2008. – Vol. 18. – №. 4. – P. 616–623.
45. Sakai, T. Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of *Fucobacter marina* and study of appropriate conditions for its enzyme digestion / T. Sakai, H. Kimura, I. Kato // *Marine Biotechnology*. – 2003. – Vol. 5. – P. 380–387.

46. Colin, S. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans / S. Colin, E. Deniaud, M. Jam, V. Descamps, Y. Chevolut, N. Kervarec, T. Barbeyron, J.C. Yvin, G. Michel, B. Kloareg // *Glycobiology*. – 2006. – Vol. 16. – №. 11. – P. 1021–1032.
47. Vickers, C. Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to α -l-fucosidases from GH29 / C. Vickers, F. Liu, K. Abe, O. Salama-Alber, M. Jenkins, C.M. Springate, J.E. Burke, S.G. Withers, A.B. Boraston // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293. – №. 47. – P. 18296–18308.
48. Schultz-Johansen, M. Discovery and screening of novel metagenome-derived GH 107 enzymes targeting sulfated fucans from brown algae / M. Schultz-Johansen, M. Cueff, K. Hardouin, M. Jam, R. Larocque, M.A. Glaring, C. Hervé, M. Czjzek, P. Stougaard // *The FEBS journal*. – 2018. – Vol. 285. – №. 22. – P. 4281–4295.
49. Vuillemin, M. Functional characterization of a new GH107 endo- α -(1, 4)-fucoidanase from the marine bacterium *Formosa haliotis* / M. Vuillemin, A.S. Silchenko, H.T.T. Cao, M.S. Kokoulin, V.T.D. Trang, J. Holck, S.P. Ermakova, A.S. Meyer, M.D. Mikkelsen // *Marine drugs*. – 2020. – Vol. 18. – №. 11. – P. 562.
50. Trang V.T.D. The endo- α (1, 4) specific fucoidanase Fhf2 from *Formosa haliotis* releases highly sulfated fucoidan oligosaccharides / V.T.D. Trang, M.D. Mikkelsen, M. Vuillemin, S. Meier, H.T.T. Cao, J. Muschiol, V. Perna, T.T. Nguyen, V.H.N. Tran, J. Holck, T.T.T. Van, H.H.N. Khanh, A.S. Meyer // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 13. – P. 823668.
51. Silchenko, A.S. Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri* / A.S. Silchenko, A.B. Rasin, M.I. Kusaykin, A.I. Kalinovskiy, Z. Miansong, L. Changheng, O. Malyarenko, A.O. Zueva, T.N. Zvyagintseva, S.P. Ermakova // *Carbohydrate polymers*. – 2017. – Vol. 175. – P. 654–660.
52. Silchenko, A.S. Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae* / A.S. Silchenko, N.E. Ustyuzhanina, M.I. Kusaykin, V.B. Krylov, A.S. Shashkov, A.S. Dmitrenok, R.V. Usoltseva, A.O. Zueva, N.E. Nifantiev, T.N. Zvyagintseva // *Glycobiology*. – 2017. – Vol. 27. – №. 3. – P. 254–263.
53. Qiu, Y. Expression and biochemical characterization of a novel fucoidanase from *Flavobacterium algicola* with the principal product of fucoidan-derived disaccharide / Y. Qiu, H. Jiang, Y. Dong, Y. Wang, H.I. Hamouda, M.A. Balah, X. Mao // *Foods*. – 2022. – Vol. 11. – №. 7. – P. 1025.

54. Zueva, A.O. Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T / A.O. Zueva, A.S. Silchenko, A.B. Rasin, M.I. Kusaykin, R.V. Usoltseva, A.I. Kalinovsky, V.V. Kurilenko, T.N. Zvyagintseva, P.D. Thinh, S.P. Ermakova // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 3025–3037.
55. Zueva, A.O. Production of high-and low-molecular weight fucoidan fragments with defined sulfation patterns and heightened in vitro anticancer activity against TNBC cells using novel endo-fucanases of the GH107 family / A.O. Zueva, A.S. Silchenko, A.B. Rasin, O.S. Malyarenko, M.I. Kusaykin, A.I. Kalinovsky, S.P. Ermakova // Carbohydrate Polymers. – 2023. – P. 121128.
56. Tran, V.H.N. The endo- α (1, 3)-fucoidanase Mef2 releases uniquely branched oligosaccharides from *Saccharina latissima* fucoidans / V.H.N. Tran, T.T. Nguyen, S. Meier, J. Holck, H.T.T. Cao, T.T.T. Van, A.S. Meyer, M.D. Mikkelsen // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20. – №. 5. – P. 305.
57. Shen, J. Discovery and characterization of an endo-1, 3-fucanase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*: A novel glycoside hydrolase family / J. Shen, Y. Chang, Y. Zhang, X. Mei, C. Xue // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 1674.
58. Haggag, Y.A. Fucoidan in pharmaceutical formulations: A comprehensive review for smart drug delivery systems / Y.A. Haggag, A.A. Abd Elrahman, R. Ulber, A. Zayed // Marine Drugs. – 2023. – Vol. 21. – №. 2. –P. 112.
59. Fitton, J.H. Topical benefits of two fucoidan-rich extracts from marine macroalgae / J.H. Fitton, G. Dell'Acqua, V.A. Gardiner, S.S. Karpinić, D N. Stringer, E. Davis // Cosmetics. – 2015. – Vol. 2. – №. 2. – P. 66–81.
60. Vo, T.S. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods / T.S. Vo, S.K. Kim // Journal of Functional foods. – 2013. – Vol. 5. – №. 1. – P. 16–27.
61. Kylin H. Zur Biochemie der Meeresalgen / H. Kylin // Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. – 1913. – Vol. 83. – № 3. – P. 171–197.
62. McNeely, W.H. Fucoidan. Industrial gums / W.H. McNeely. – New York. : Academic Press, 1959. – 117–125 pp.
63. Усов, А.И. Фукоиданы-сульфатированные полисахариды бурых водорослей / А.И. Усов, М.И. Билан // Успехи химии. – 2009. – Т. 78. – №. 8. – С. 846–862.

64. Zvyagintseva, T.N. Structural diversity of fucoidans and their radioprotective effect / T.N. Zvyagintseva, R.V. Usoltseva, N.M. Shevchenko, V.V. Surits, T.I. Imbs, O.S. Malyarenko, N.N. Besednova, L.A. Ivanushko, S.P. Ermakova // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 273. – P. 118551.
65. Ribeiro, A.C. A sulfated α -L-fucan from sea cucumber / A.C. Ribeiro, R.P. Vieira, P.A. Mourão, B. Mulloy // *Carbohydrate research*. – 1994. – Vol. 255. – P. 225–240.
66. Mourão, P.A.S. Highly acidic glycans from sea cucumbers: Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea* / P.A.S. Mourão, I.G. Bastos // *European Journal of Biochemistry*. – 1987. – Vol. 166. – №. 3. – P. 639–645.
67. Vasseur, E. Chemical studies on the jelly coat of the sea-urchin egg / E. Vasseur, K. Setälä, P. Gjertsen // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1948. – Vol. 2. – P. 900-913.
68. Mulloy, B. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions / B. Mulloy, A.C. Ribeiro, A.P. Alves, R.P. Vieira, P.A. Mourão // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – №. 35. – P. 22113–22123.
69. Salmeán, A.A. Microarray glycan profiling reveals algal fucoidan epitopes in diverse marine metazoans / A.A. Salmeán, C. Hervé, B. Jørgensen, W.G. Willats, J. Mravec // *Frontiers in Marine Science*. – 2017. – Vol. 4. – P. 293.
70. Huang, G. Secretion of sulfated fucans by diatoms may contribute to marine aggregate formation / G. Huang, S. Vidal-Melgosa, A. Sichert, S. Becker, Y. Fang, J. Niggemann, M.H. Iversen, J.H. Hehemann // *Limnology and Oceanography*. – 2021. – Vol. 66. – №. 10. – P. 3768–3782.
71. Vidal-Melgosa, S. Diatom fucan polysaccharide precipitates carbon during algal blooms / S. Vidal-Melgosa, A. Sichert, T.B. Francis, D. Bartosik, J. Niggemann, A. Wichels, W.G.T. Willats, B.M. Fuchs, H. Teeling, D. Becher, T. Schweder, R. Amann, J.H. Hehemann // *Nature communications*. – 2021. – Vol. 12. – №. 1. – P. 1150.
72. Усов, А.И. Полисахариды водорослей. 55. Полисахаридный состав некоторых бурых водорослей Камчатки / А.И. Усов, Г.П. Смирнова, Н.Г. Клочкова // *Биоорганическая химия*. – 2001. – Т. 27. – №. 6. – С. 444–448.

73. Kloareg, B. Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae / B. Kloareg, M. Demarty, S. Mabeau // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1986. – Vol. 8. – №. 6. – P. 380–386.
74. Skriptsova, A.V. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus / A.V. Skriptsova // *Russian Journal of Marine Biology*. – 2015. – Vol. 41. – P. 145–156.
75. Torode, T.A. Monoclonal antibodies directed to fucoidan preparations from brown algae / T.A. Torode, S.E. Marcus, M. Jam, T. Tonon, R.S. Blackburn, C. Hervé, J.P. Knox // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – №. 2. – P. e0118366.
76. Skriptsova, A.V. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) / A.V. Skriptsova, N.M. Shevchenko, T.N. Zvyagintseva, T.I. Imbs // *Journal of Applied Phycology*. – 2010. – Vol. 22. – P. 79–86.
77. Imbs, T.I. Seasonal variations of the composition and structural characteristics of polysaccharides from the brown alga *Costaria costata* / T.I. Imbs, N.M. Shevchenko, S.V. Sukhoverkhov, T.L. Semenova, A.V. Skriptsova, T.N. Zvyagintseva // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2009. – Vol. 45. – P. 786–791.
78. Berteau, O. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide / O. Berteau, B. Mulloy // *Glycobiology*. – 2003. – Vol. 13. – №. 6. – P. 29R–40R.
79. Larsen, B. Sulphated Polysaccharides in Brown Algae. I. Isolation and Preliminary Characterisation of Three Sulphated Polysaccharides from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. / B. Larsen, A. Haug, T.J. Painter, K. Marøy, J. Brunvoll, E. Bunnenberg, C. Djerassi, R. Records // *Acta chemica scandinavica*. – 1966. – Vol. 20. – P. 219–230.
80. Percival, E. Glucuronoxylfucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. Part I / E. Percival // *Carbohydrate Research*. – 1968. – Vol. 7. – №. 3. – P. 272–283.
81. Medcalf, D.G. Structural features of a novel glucuronogalactofucan from *Ascophyllum nodosum* / D.G. Medcalf, T.L. Schneider, R.W. Barnett // *Carbohydrate Research*. – 1978. – Vol. 66. – №. 1. – P. 167–171.
82. Zayed, A. Fucoidan characterization: Determination of purity and physicochemical and chemical properties / A. Zayed, M. El-Aasr, A.R.S. Ibrahim, R. Ulber // *Marine drugs*. – 2020. – Vol. 18. – №. 11. – P. 571.

83. García-Vaquero, M. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification / M. García-Vaquero, G. Rajauria, J.V. O'Doherty, T. Sweeney // *Food research international*. – 2017. – Vol. 99. – P. 1011–1020.
84. Dobrinčić, A. Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides / A. Dobrinčić, S. Balbino, Z. Zorić, S. Pedisić, D. Bursać Kovačević, I. Elez Garofulić, V. Dragović-Uzelac // *Marine drugs*. – 2020. – Vol. 18. – №. 3. – P. 168.
85. Anastyuk, S.D. Structural analysis of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass spectrometry / S.D. Anastyuk, N.M. Shevchenko, E.L. Nazarenko, P.S. Dmitrenok, T.N. Zvyagintseva // *Carbohydrate research*. – 2009. – Vol. 344. – №. 6. – P. 779–787.
86. Anastyuk, S.D. Tandem mass spectrometry of fucoidan-derived fragments, labeled with heavy-oxygen / S.D. Anastyuk, N.M. Shevchenko, K.V. Belokozova, P.S. Dmitrenok // *Carbohydrate research*. – 2018. – Vol. 455. – P. 10–13.
87. Silchenko, A.S. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae* / A.S. Silchenko, A.B. Rasin, M.I. Kusaykin, O.S. Malyarenko, N.M. Shevchenko, A.O. Zueva, A.I. Kalinovsky, T.N. Zvyagintseva, S.P. Ermakova // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – Vol. 193. – P. 189–195.
88. Chevlot, L. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae / L. Chevlot, B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault, S. Collic-Jouault // *Carbohydrate Research*. – 2001. – Vol. 330. – №. 4. – P. 529–535.
89. Bilan, M.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag / M.I. Bilan, A.A. Grachev, N.E. Ustuzhanina, A.S. Shashkov, N.E. Nifantiev, A.I. Usov // *Carbohydrate research*. – 2002. – Vol. 337. – №. 8. – P. 719–730.
90. Kusaykin, M.I. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates / M.I. Kusaykin, A.O. Chizhov, A.A. Grachev, S.A. Alekseeva, I.Y. Bakunina, O.I. Nedashkovskaya, V.V. Sova, T.N. Zvyagintseva // *Journal of Applied Phycology*. – 2006. – Vol. 18. – P. 369–373.
91. Rasin, A.B. Enzymatic transformation and anti-tumor activity of *Sargassum horneri* fucoidan / A.B. Rasin, A.S. Silchenko, M.I. Kusaykin, O.S. Malyarenko, A.O. Zueva, A.I. Kalinovsky, J. Airong, V.V. Surits, S.P. Ermakova // *Carbohydrate polymers*. – 2020. – Vol. 246. – P. 116635.

92. Preeprame, S. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri* / S. Preeprame, K. Hayashi, J.B. Lee, U. Sankawa, T. Hayashi // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2001. – Vol. 49. – №. 4. – P. 484–485.
93. Fernando, I.P.S. Low molecular weight fucoidan fraction ameliorates inflammation and deterioration of skin barrier in fine-dust stimulated keratinocytes / I.P.S. Fernando, M.K.H.M. Dias, D.M.D. Madusanka, E.J. Han, M.J. Kim, S.J. Heo, K. Lee, S.H. Cheong, G. Ahn // International journal of biological macromolecules. – 2021. – Vol. 168. – P. 620–630.
94. Synytsya, A. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida* / A. Synytsya, W.J. Kim, S.M. Kim, R. Pohl, A. Synytsya, J. Čopíková, F. Kvasnička, Y.I. Park // Carbohydrate Polymers. – 2010. – Vol. 81. – №. 1. – P. 41–48.
95. Lee, J.B. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu) / J.B. Lee, K. Hayashi, M. Hashimoto, T. Nakano, T. Hayashi // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2004. – Vol. 52. – №. 9. – P. 1091–1094.
96. Zhao, Y. Fucoidan extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for nutraceuticals/functional foods / Y. Zhao, Y. Zheng, J. Wang, S. Ma, Y. Yu, W.L. White, S. Yang, F. Yang, J. Lu // Marine drugs. – 2018. – Vol. 16. – №. 9. – P. 321.
97. Hemmingson, J. A. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta) / J.A. Hemmingson, R. Falshaw, R.H. Furneaux, K. Thompson // Journal of Applied Phycology. – 2006. – Vol. 18. – P. 185–193.
98. Yoon, S.J. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity / S.J. Yoon, Y.R. Pyun, J.K. Hwang, P.A. Mourão // Carbohydrate Research. – 2007. – Vol. 342. – №. 15. – P. 2326–2330.
99. Kwak, J.Y. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development / J.Y. Kwak // Marine drugs. – 2014. – Vol. 12. – №. 2. – P. 851–870.
100. Jin, J.O. Seaweeds in the oncology arena: Anti-cancer potential of fucoidan as a drug—A review / J.O. Jin, D. Yadav, K. Madhwani, N. Puranik, V. Chavda, M. Song // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – №. 18. – P. 6032.
101. Tsai, H.L. Efficacy of low-molecular-weight fucoidan as a supplemental therapy in metastatic colorectal cancer patients: A double-blind randomized controlled trial / H.L. Tsai, C.J. Tai, C.W. Huang, F.R. Chang, J.Y. Wang // Marine drugs. – 2017. – Vol. 15. – №. 4. – P. 122.

102. Kundu, J.K. Inflammation: gearing the journey to cancer / J.K. Kundu, Y.J. Surh // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2008. – Vol. 659. – №. 1–2. – P. 15–30.
103. Sanjeeva, K.K.A. Anti-inflammatory mechanisms of fucoidans to treat inflammatory diseases: A review / K.K.A. Sanjeeva, K.H. Herath, H.W. Yang, C.S. Choi, Y.J. Jeon // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19. – №. 12. – P. 678.
104. Preobrazhenskaya, M.E. Fucoidan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand / M.E. Preobrazhenskaya, A.E. Berman, V.I. Mikhailov, N.A. Ushakova, A.V. Mazurov, A.V. Semenov, A.I. Usov, N.E. Nifant'ev, N.V. Bovin // IUBMB Life. – 1997. – Vol. 43. – №. 2. – P. 443–451.
105. Li, Y. Immunopotentiating activity of fucoidans and relevance to cancer immunotherapy / Y. Li, E. McGowan, S. Chen, J. Santos, H. Yin, Y. Lin // Marine Drugs. – 2023. – Vol. 21. – №. 2. – P. 128.
106. Wang, W. Inhibition of influenza a virus infection by fucoidan targeting viral neuraminidase and cellular EGFR pathway / W. Wang, J. Wu, X. Zhang, C. Hao, X. Zhao, G. Jiao, X. Shan, W. Tai, G. Yu // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 40760.
107. Sun, T. Studies on antiviral and immuno-regulation activity of low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica* / T. Sun, X. Zhang, Y. Miao, Y. Zhou, J. Shi, M. Yan, A. Chen // Journal of Ocean University of China. – 2018. – Vol. 17. – P. 705–711.
108. Krylova, N.V. Antiviral activity of native and modified fucoidans from brown algae *Fucus evanescens* in vitro and in vivo: A comparative analysis / N.V. Krylova, S.P. Ermakova, V.F. Lavrov, I.A. Leneva, G.G. Kompanets, O.V. Iunikhina, M.N. Nosik, L.K. Ebraldize, I.N. Falynskova, A. S. Silchenko, Zaporozhets, T.S. // Recent Progress in Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 6. – P. 1–18.
109. Lapshina, L.A. Inhibitory effect of fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* on the spread of infection induced by tobacco mosaic virus in tobacco leaves of two cultivars / L.A. Lapshina, A.V. Reunov, V.P. Nagorskaya, T.N. Zvyagintseva, N.M. Shevchenko // Russian Journal of Plant Physiology. – 2006. – Vol. 53. – P. 246–251.
110. Dinesh, S. In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii* / S. Dinesh, T. Menon, L.E. Hanna, V. Suresh, M. Sathuvan, M. Manikannan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – Vol. 82. – P. 83–88.

111. Thuy, T.T.T. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species / T.T.T. Thuy, B.M. Ly, T.T.T. Van, N. Van Quang, H.C. Tu, Y. Zheng, C. Seguin-Devaux, B. Mi, U. Ai // Carbohydrate polymers. – 2015. – Vol. 115. – P. 122–128.
112. Yim, S.K. Inhibition of SARS-CoV-2 virus entry by the crude polysaccharides of seaweeds and abalone viscera in vitro / S.K. Yim, K. Kim, I. Kim, S. Chun, T. Oh, J.U. Kim, W.H. Jung, H. Moon, B. Ku, K. Jung // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19. – №. 4. – P. 219.
113. Song, S. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2 / S. Song, H. Peng, Q. Wang, Z. Liu, X. Dong, C. Wen, C. Ai, Y. Zhang, Z. Wang, B. Zhu // Food & function. – 2020. – Vol. 11. – №. 9. – P. 7415–7420.
114. Кузнецова, Т.А. Оценка адьювантных эффектов фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его структурных аналогов для усиления эффективности вакцин / Т.А. Кузнецова, Л.А. Иванушко, Е.В. Персиянова, А.Л. Шутикова, С.П. Ермакова, М.Ю. Хотимченко, Н.Н. Беседнова // Биомедицинская химия. – 2017. – Vol. 63. – №. 6. – P. 553–558.
115. Oka, S. Properties of fucoidans beneficial to oral healthcare / S. Oka, M. Okabe, S. Tsubura, M. Mikami, A. Imai // Odontology. – 2020. – Vol. 108. – P. 34–42.
116. Ushakova, N.A. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae / N.A. Ushakova, G.E. Morozovich, N.E. Ustyuzhanina, M.I. Bilan, A.I. Usov, N.E. Nifantiev, M.E. Preobrazhenskaya // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2009. – Vol. 3. – P. 77–83.
117. Dockal, M. Structure-activity relationship of pro-and anticoagulant effects of *Fucus vesiculosus* fucoidan / M. Dockal, S. Till, Z. Zhang, S. Knappe, S. Reutterer, C. Quinn, C. Redl, H.J. Ehrlich, F. Scheiflinger, C. Szabo // Blood. – 2012. – Vol. 120. – №. 21. – P. 3353.
118. Zhang, Z. Screening of complex fucoidans from four brown algae species as procoagulant agents / Z. Zhang, S. Till, S. Knappe, C. Quinn, J. Catarello, G.J. Ray, F. Scheiflinger, C. Szabo, M. Dockal // Carbohydrate polymers. – 2015. – Vol. 115. – P. 677–685.
119. Jin, W. Fucoidans inhibited tau interaction and cellular uptake / W. Jin, C. Lu, Y. Zhu, J. Zhao, W. Zhang, L. Wang, L.J. Linhardt, C. Wang, L. Zhang // Carbohydrate Polymers. – 2023. – Vol. 299. – P. 120176.
120. Somogyi, M. Notes on sugar determination / M. Somogyi // Journal of biological chemistry. – 1952. – Vol. 195. – P. 19–23.

121. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose / N. Nelson // *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier. – 1944. – Vol. 153. – № 2. – P. 375–380.
122. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // *Analytical chemistry*. – 1959. – Vol. 31. – № 3. – P. 426–428.
123. Lever, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates / M. Lever // *Analytical biochemistry*. – 1972. – Vol. 47. – № 1. – P. 273–279.
124. Park, J.T. A submicrodetermination of glucose / J.T. Park, M.J. Johnson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1949. – Vol. 181. – № 1. – P. 149–151.
125. Waffenschmidt, S. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2, 2'-bichinoninate / S. Waffenschmidt, L. Jaenicke // *Analytical biochemistry*. – 1987. – Vol. 165. – № 2. – P. 337–340.
126. Silchenko, A.S. A simple plate method for the screening and detection of fucoidanases / A.S. Silchenko, H.H. N. Khanh, C.T.T. Hang, V.V. Kurilenko, A.M. Zakharenko, A.O. Zueva, B.M. Ly, M.I. Kusaykin // *Achievements in the Life Sciences*. – 2015. – Vol. 9. – № 2. – P. 104–106.
127. Almin, K.E. Enzymic degradation of polymers: I. Viscometric method for the determination of enzymic activity / K.E. Almin, K.E. Eriksson // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. – 1967. – Vol. 139. – № 2. – P. 238–247.
128. Cao, H.T.T. Novel enzyme actions for sulphated galactofucan depolymerisation and a new engineering strategy for molecular stabilisation of fucoidan degrading enzymes / H.T. Cao, M.D. Mikkelsen, M.J. Lezyk, L.M. Bui, V.T. Tran, A.S. Silchenko, M.I. Kusaykin, T.D. Pham, B.H. Truong, J. Holck, A.S. Meyer // *Marine drugs*. – 2018. – Vol. 16. – № 11. – P. 422.
129. Rigouin, C. Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides / C. Rigouin, C.D. Ladrat, C. Siquin, S. Collic-Jouault, M. Dion // *Carbohydrate polymers*. – 2009. – Vol. 76. – № 2. – P. 279–284.
130. Sakai, T. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes / T. Sakai, K. Ishizuka, K. Shimanaka, K. Ikai, I. Kato // *Marine Biotechnology*. – 2003. – Vol. 5. – P. 536–544.
131. Sakai, T. Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides / T. Sakai, H. Kimura, K. Kojima, K. Shimanaka, K. Ikai, I. Kato // *Marine biotechnology*. – 2003. – Vol. 5. – P. 70–78.

132. Yu, L. Enzymatic preparation and structural determination of oligosaccharides derived from sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan / L. Yu, X. Xu, C. Xue, Y. Chang, L. Ge, Y. Wang, C. Zhang, G. Liu, C. He // *Food chemistry*. – 2013. – Vol. 139. – №. 1–4. – P. 702–709.
133. Kitamura, K. Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis* / K. Kitamura, M. Matsuo, Y. Tsuneo // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 1992. – Vol. 56. – №. 3. – P. 490–494.
134. Билан, М.И. Действие ферментного препарата из морского моллюска *Littorina kurila* на фукоидан из бурой водоросли *Fucus distichus* / М.И. Билан, М.И. Кусайкин, А.А. Грачев, Е.А. Цветкова, Т.Н. Звягинцева, Н.Э. Нифантьев, А.И. Усов // *Биохимия*. – 2005. – Vol. 70. – №. 12. – P. 1606–1612.
135. Bilan, M.I. Preliminary investigation of a highly sulfated galactofucan fraction isolated from the brown alga *Sargassum polycystum* / M.I. Bilan, A.A. Grachev, A.S. Shashkov, T.T.T. Thuy, T.T.T. Van, B.M. Ly, N.E. Nifantiev, A.I. Usov // *Carbohydrate research*. – 2013. – Vol. 377. – P. 48–57.
136. Bilan, M.I. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima* / M.I. Bilan, A.A. Grachev, A.S. Shashkov, M. Kelly, C.J. Sanderson, N.E. Nifantiev, A.I. Usov // *Carbohydrate research*. – 2010. – Vol. 345. – №. 14. – P. 2038–2047.
137. Ale, M.T. Fucoidans from brown seaweeds: An update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation / M.T. Ale, A.S. Meyer // *Rsc Advances*. – 2013. – Vol. 3. – №. 22. – P. 8131–8141.
138. Deniaud-Bouët, E. A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges / E. Deniaud-Bouët, K. Hardouin, P. Potin, B. Kloareg, C. Hervé // *Carbohydrate polymers*. – 2017. – Vol. 175. – P. 395–408.
139. Deniaud-Bouët, E. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae / E. Deniaud-Bouët, N. Kervarec, G. Michel, T. Tonon, B. Kloareg, C. Hervé // *Annals of Botany*. – 2014. – Vol. 114. – №. 6. – P. 1203–1216.

140. Ohshiro, T. Isolation and characterization of a novel fucoidan-degrading microorganism / T. Ohshiro, Y. Ohmoto, Y. Ono, R. Ohkita, Y. Miki, H. Kawamoto, Y. Izumi // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2010. – Vol. 74. – №. 8. – P. 1729–1732.
141. Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter – NY. : Garland Science, 2001. – 129–188 pp.
142. Yang, Y.H. Structural insights into SraP-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to host cells / Y.H. Yang, Y.L. Jiang, J. Zhang, L. Wang, X.H. Bai, S.J. Zhang, Y.M. Ren, N. Li, Y.H. Zhang, Z. Zhang, C.Z. Zhou // *PLoS pathogens*. – 2014. – Vol. 10. – №. 6. – P. e1004169.
143. Sulzenbacher, G. Crystal structure of *Thermotoga maritima* α -L-fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis / G. Sulzenbacher, C. Bignon, T. Nishimura, C.A. Tarling, S.G. Withers, B. Henrissat, Y. Bourne // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – №. 13. – P. 13119–13128.
144. Silchenko, A.S. Fucoidan-active α -L-fucosidases of the GH29 and GH95 families from a fucoidan degrading cluster of the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* / A.S. Silchenko, N.K. Rubtsov, A.O. Zueva, M.I. Kusaykin, A.B. Rasin, S.P. Ermakova // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2022. – Vol. 728. – P. 109373.
145. Nagamine, T. Intestinal absorption of fucoidan extracted from the brown seaweed, *Cladosiphon okamuranus* / T. Nagamine, K. Nakazato, S. Tomioka, M. Iha, K. Nakajima // *Marine drugs*. – 2014. – Vol. 13. – №. 1. – P. 48–64.
146. Bai, X. Study on absorption mechanism and tissue distribution of fucoidan / X. Bai, E. Zhang, B. Hu, H. Liang, S. Song, A. Ji, // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – №. 5. – P. 1087.
147. Hisada, N. Low-molecular-weight hyaluronan permeates through human intestinal Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway / N. Hisada, H. Satsu, A. Mori, M. Totsuka, J.I. Kamei, T. Nozawa, M. Shimizu // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2008. – Vol. 72. – №. 4. – P. 1111–1114.
148. Grabovac, V. Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain / V. Grabovac, A. Bernkop-Schnürch // *International journal of pharmaceutics*. – 2006. – Vol. 326. – №. 1–2. – P. 153–159.
149. Wang, M. Fucoidan-derived functional oligosaccharides: Recent developments, preparation, and potential applications / M. Wang, S. Veeraperumal, S. Zhong, K.L. Cheong // *Foods*. – 2023. – Vol. 12. – №. 4. – P. 878.

150. Pomin, V.H. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: A selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides / V.H. Pomin, A.P. Valente, M.S. Pereira, P.A. Mourão // *Glycobiology*. – 2005. – Vol. 15. – №. 12. – P. 1376–1385.
151. Choi, J. Effect of gamma irradiation on the structure of fucoidan / J.I. Choi, S.G. Lee, S.J. Han, M. Cho, P.C. Lee // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2014. – Vol. 100. – P. 54–58.
152. Basso, A. Industrial applications of immobilized enzymes—A review / A. Basso, S. Serban // *Molecular Catalysis*. – 2019. – Vol. 479. – P. 110607.
153. Su, Y. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine / Y. Su, C. Liu, H. Fang, D. Zhang // *Microbial cell factories*. – 2020. – Vol. 19. – №. 1. – P. 1–12.
154. Anastyuk, S.D. Anticancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry / S.D. Anastyuk, N.M. Shevchenko, S.P. Ermakova, O.S. Vishchuk, E.L. Nazarenko, P.S. Dmitrenok, T.N. Zvyagintseva // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 87. – №. 1. – P. 186–194.
155. Chen, M.C. Low molecular weight fucoidan inhibits tumor angiogenesis through downregulation of HIF-1/VEGF signaling under hypoxia / M.C. Chen, W.L. Hsu, P.A. Hwang, T.C. Chou // *Marine drugs*. – 2015. – Vol. 13. – №. 7. – P. 4436–4451.
156. Chen, L.M. Oligo-Fucoidan prevents IL-6 and CCL2 production and cooperates with p53 to suppress ATM signaling and tumor progression / L.M. Chen, P.Y. Liu, Y.A. Chen, H.Y. Tseng, P.C. Shen, P.A. Hwang, H.L. Hsu // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – №. 1. – P. 11864.
157. Huang, C.W. Low-molecular-weight fucoidan as complementary therapy of fluoropyrimidine-based chemotherapy in colorectal cancer / C.W. Huang, Y.C. Chen, T.C. Yin, P.J. Chen, T.K. Chang, W.C. Su, C.J. Ma, C.C. Li, H.L. Tsai, J.Y. Wang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – №. 15. – P. 8041.
158. Cho, M.L. Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their in vitro anticancer activity / M.L. Cho, B.Y. Lee, S. You // *Molecules*. – 2010. – Vol. 16. – №. 1. – P. 291–297.
159. Lu, J. Fucoidan extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida*—physicochemical comparison against five other fucoidans: Unique low molecular weight fraction bioactivity in breast cancer cell lines / J. Lu, K.K. Shi, S. Chen, J. Wang, A. Hassouna, L.N. White, F. Merien,

- M. Xie, Q. Kong, J. Li, T. Ying, W.L. White, S. Nie // *Marine drugs*. – 2018. – Vol. 16. – №. 12. – P. 461.
160. Zhang, Z. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium-and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells / Z. Zhang, K. Teruya, H. Eto, S. Shirahata // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2013. – Vol. 77. – №. 2. – P. 235–242.
161. Azuma, K. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model / K. Azuma, T. Ishihara, H. Nakamoto, T. Amaha, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, S. Minami, O. Takashima, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto, H. Kawamoto, Y. Okamoto // *Marine drugs*. – 2012. – Vol. 10. – №. 10. – P. 2337–2348.
162. Kasai, A. Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells / A. Kasai, S. Arafuka, N. Koshihara, D. Takahashi, K. Toshima // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2015. – Vol. 13. – №. 42. – P. 10556–10568.
163. Lee, N.Y. Fucoidan from *Laminaria cichorioides* inhibits AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cells / N.Y. Lee, S.P. Ermakova, H.K. Choi, M.I. Kusaykin, N.M. Shevchenko, T.N. Zvyagintseva, H.S. Choi // *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*. – 2008. – Vol. 47. – №. 8. – P. 629–637.
164. Lee, N.Y. Inhibitory effects of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6 Cl41 cells / N.Y. Lee, S.P. Ermakova, T.N. Zvyagintseva, K.W. Kang, Z. Dong, H.S. Choi // *Food and chemical Toxicology*. – 2008. – Vol. 46. – №. 5. – P. 1793–1800.
165. Eferl, R. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis / R. Eferl, E.F. Wagner // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – №. 11. – P. 859–868.
166. Malliri, A. The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, motility, and in vitro invasion of A431 cells / A. Malliri, M. Symons, R.F. Hennigan, A.F. Hurlstone, R.F. Lamb, T. Wheeler, B.W. Ozanne // *The Journal of cell biology*. – 1998. – Vol. 143. – №. 4. – P. 1087–1099.
167. Dhar, A. The role of AP-1, NF- κ B and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive / A. Dhar, M.R. Young, N.H. Colburn // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2002. – Vol. 234. – P. 185–193.

168. Chen, F. *Wenyingshuangia fucanilytica* sp. nov., a sulfated fucan utilizing bacterium isolated from shallow coastal seawater / F. Chen, Y. Chang, S. Dong, C. Xue // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2016. – Vol. 66. – №. 9. – P. 3270–3275.
169. Chang, Y. Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium / Y. Chang, C. Xue, Q. Tang, D. Li, X. Wu, J. Wang // Letters in applied microbiology. – 2010. – Vol. 50. – №. 3. – P. 301–307.
170. Lasica, A.M. The type IX secretion system (T9SS): highlights and recent insights into its structure and function / A.M. Lasica, M. Ksiazek, M. Madej, J. Potempa // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2017. – Vol. 7. – P. 215.
171. Hoppert M. Metalloenzymes. Encyclopedia of Earth Sciences Series / M. Hoppert. – Netherlands. : Springer, 2011. – 558–563 pp.
172. Benkovic, S.J. Metal Ion-Activated Enzymes / S.J. Benkovic // Catalysis Progress in Research: Proceedings. – 1972. – P. 43–46.
173. Chevotot L. et al. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity / L. Chevotot, A. Foucault, F. Chaubet, N. Kervarec, C. Siquin, A.M. Fisher, C. Boisson-Vidal // Carbohydrate Research. – 1999. – Vol. 319. – №. 1-4. – P. 154–165.
174. Menshova, R.V. Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: Structure and biological activity / R.V. Menshova, N.M. Shevchenko, T.I. Imbs, T.N. Zvyagintseva, O.S. Malyarenko, T.S. Zaporoshets, N.N. Besednova, S.P. Ermakova // Frontiers in Marine Science. – 2016. – Vol. 3. – P. 129.
175. Usoltseva, R.V. Fucoidans from brown algae *Laminaria longipes* and *Saccharina cichorioides*: Structural characteristics, anticancer and radiosensitizing activity in vitro / R.V. Usoltseva, N.M. Shevchenko, O.S. Malyarenko, S.D. Anastyuk, A.E. Kasprik, N.V. Zvyagintsev, S.P. Ermakova // Carbohydrate polymers. – 2019. – Vol. 221. – P. 157–165.
176. Krylova, N.V. In vitro anti-orthohantavirus activity of the high-and low-molecular-weight fractions of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* / N.V. Krylova, A.S. Silchenko, A.B. Pott, S.P. Ermakova, O.V. Iunikhina, A.B. Rasin, G.G. Kompanets, G.N. Likhatskaya, M.Y. Shchelkanov // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19. – №. 10. – P. 577.
177. Silchenko, A.S. Discovery of a fucoidan endo-4O-sulfatase: Regioselective 4O-desulfation of fucoidans and its effect on anticancer activity in vitro / A.S. Silchenko, A.B. Rasin, A.O. Zueva,

- M.I. Kusaykin, T.N. Zvyagintseva, N.K. Rubtsov, S.P. Ermakova // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 271. – P. 118449.
178. Cao, C. Structure and in vitro hypoglycemic activity of a homogenous polysaccharide purified from *Sargassum pallidum* / C. Cao, B. Zhang, C. Li, Q. Huang, X. Fu, R.H. Liu // *Food & function*. – 2019. – Vol. 10. – №. 5. – P. 2828–2838.
179. Luo, D. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Sargassum thunbergii* and its antioxidant and anti-inflammation effects / D. Luo, Z. Wang, K. Nie // *Plos one*. – 2019. – Vol. 14. – №. 10. – P. e0223198.
180. Murphy, K.J. A new model for the domain structure of heparan sulfate based on the novel specificity of K5 lyase / K.J. Murphy, C.L. Merry, M. Lyon, J.E. Thompson, I.S. Roberts, J.T. Gallagher // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – №. 26. – P. 27239–27245.
181. Van Kuppevelt, T.H. Sequencing of glycosaminoglycans with potential to interrogate sequence-specific interactions / T.H. Van Kuppevelt, A. Oosterhof, E.M. Versteeg, E. Podhumljak, E.M. Van de Westerlo, W.F. Daamen // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – №. 1. – P. 14785.
182. Malyarenko, O.S. Fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* potentiates the anti-proliferative efficacy of asterosaponins from starfish *Asteropsis carinifera* in 2D and 3D models of melanoma cells / O.S. Malyarenko, T.V. Malyarenko, R.V. Usoltseva, A.S. Silchenko, A.A. Kicha, N.V. Ivanchina, S.P. Ermakova // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 185. – P. 31–39.
183. Vishchuk, O.S. PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase is a target of the fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* in the prevention of EGF-induced neoplastic cell transformation and colon cancer growth / O.S. Vishchuk, H. Sun, Z. Wang, S.P. Ermakova, J. Xiao, T. Lu, P.P. Xue, T.N. Zvyagintseva, H. Xiong, C. Shao, W. Yan, Q. Duan, F. Zhu // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – №. 14. – P. 18763.
184. Imbs, T.I. Structural elucidation of polysaccharide fractions from the brown alga *Coccophora langsdorfii* and in vitro investigation of their anticancer activity / T.I. Imbs, S.P. Ermakova, O.S. Malyarenko, V.V. Isakov, T.N. Zvyagintseva // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 135. – P. 162–168.
185. Vishchuk, O.S. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure–function relationship / O.S. Vishchuk, S.P. Ermakova, T.N. Zvyagintseva // *Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 141. – №. 2. – P. 1211–1217.

186. Vishchuk, O.S. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity / O.S. Vishchuk, S.P. Ermakova, T.N. Zvyagintseva // Carbohydrate research. – 2011. – Vol. 346. – №. 17. – P. 2769–2776.
187. Borowicz, S. The soft agar colony formation assay / S. Borowicz, M. Van Scoyk, S. Avasarala, M.K.K. Rathinam, J. Tauler, R.K. Bikkavilli, R.A. Winn // Journal of Visualized Experiments. – 2014. – №. 92. – P. e51998.
188. Koyanagi, S. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities / S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, H. Shimeno // Biochemical pharmacology. – 2003. – Vol. 65. – №. 2. – P. 173–179.
189. Wee, P. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways / P. Wee, Z. Wang // Cancers. – 2017. – Vol. 9. – №. 5. – P. 52.
190. Mak, M.P. Targeting the epidermal growth factor receptor for head and neck cancer chemoprevention / M.P. Mak, W.N. William Jr // Oral oncology. – 2014. – Vol. 50. – №. 10. – P. 918–923.
191. Song, J.Y. Epidermal growth factor competes with EGF receptor inhibitors to induce cell death in EGFR-overexpressing tumor cells / J.Y. Song, S.W. Lee, J.P. Hong, S.E. Chang, H. Choe, J. Choi // Cancer letters. – 2009. – Vol. 283. – №. 2. – P. 135–142.
192. Bode, A.M. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention / A.M. Bode, Z. Dong // Progress in nucleic acid research and molecular biology. – 2005. – Vol. 79. – P. 237–297.
193. Wattenberg, L.W. Chemoprevention of cancer / L.W. Wattenberg // Cancer research. – 1985. – Vol. 45. – №. 1. – P. 1–8.
194. Sporn, M.B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period / M.B. Sporn // Cancer research. – 1976. – Vol. 36. – P. 2699–2702.
195. Cuendet, M. Molecular Targets of Botanicals Used for Chemoprevention / M. Cuendet, A. Nievergelt, J.M. Pezzuto // Integrative Oncology. Oxford University Press. – 2014. – P. 52–84.
196. Colburn, N.H. Genes that cooperate with tumor promoters in transformation / N.H. Colburn, B.M. Smith // Journal of Cellular Biochemistry. – 1987. – Vol. 34. – №. 2. – P. 129–142.

197. Bernstein, L.R. Gene regulation and genetic susceptibility to neoplastic transformation: AP-1 and p80 expression in JB6 cells / L.R. Bernstein, E.T. Ben-Ari, S.L. Simek, N.H. Colburn // *Environmental Health Perspectives*. – 1991. – Vol. 93. – P. 111–119.
198. Bernstein, L.R. AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant JB6 cells / L.R. Bernstein, N.H. Colburn // *Science*. – 1989. – Vol. 244. – №. 4904. – P. 566–569.
199. Hodin, R.A. Immediate-early gene expression in EGF-stimulated intestinal epithelial cells / R.A. Hodin, S. Meng, D. Nguyen // *Journal of Surgical Research*. – 1994. – Vol. 56. – №. 6. – P. 500–504.
200. Osborne, C.K. Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture / C.K. Osborne, B. Hamilton, G. Titus, R.B. Livingston // *Cancer Research*. – 1980. – Vol. 40. – №. 7. – P. 2361–2366.
201. Turkington, R.W. Stimulation of mammary carcinoma cell proliferation by epithelial growth factor in vitro / R.W. Turkington // *Cancer Research*. – 1969. – Vol. 29. – №. 7. – P. 1457–1458.
202. Dongre, A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer / A. Dongre, R.A. Weinberg // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2019. – Vol. 20. – №. 2. – P. 69–84.
203. Normanno, N. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer / N. Normanno, A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M.R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, D.S. Salomon // *Gene*. – 2006. – Vol. 366. – №. 1. – P. 2–16.
204. Usoltseva, R.V. The comparison of structure and anticancer activity in vitro of polysaccharides from brown algae *Alaria marginata* and *A. angusta* / R.V. Usoltseva, S.D. Anastyuk, N.M. Shevchenko, T.N. Zvyagintseva, S.P. Ermakova // *Carbohydrate polymers*. – 2016. – Vol. 153. – P. 258–265.
205. Zvyagintseva, T.N. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds / T.N. Zvyagintseva, N.M. Shevchenko, I.B. Popivnich, V.V. Isakov, A.S. Scobun, E.V. Sundukova, L.A. Elyakova // *Carbohydrate Research*. – 1999. – Vol. 322. – №. 1–2. – P. 32–39.
206. DuBois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.T. Rebers, F. Smith // *Analytical chemistry*. – 1956. – Vol. 28. – №. 3. – P. 350–356.

207. Dodgson, K.S. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides / K.S. Dodgson, R.G. Price // *Biochemical Journal*. – 1962. – Vol. 84. – №. 1. – P. 106–110.
208. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – №. 1–2. – P. 248–254.
209. Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 193. – №. 1. – P. 265–275.
210. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – №. 5259. – P. 680–685.
211. Quevillon, E. InterProScan: protein domains identifier / E. Quevillon, V. Silventoinen, S. Pillai, N. Harte, N. Mulder, R. Apweiler, R. Lopez // *Nucleic acids research*. – 2005. – Vol. 33. – №. 2. – P. W116–W120.
212. Zhang, H. dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation / H. Zhang, T. Yohe, L. Huang, S. Entwistle, P. Wu, Z. Yang, P.K. Busk, Y. Xu, Y. Yin // *Nucleic acids research*. – 2018. – Vol. 46. – №. W1. – P. W95–W101.
213. Sievers, F. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega / F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, // *Molecular systems biology*. – 2011. – Vol. 7. – №. 1. – P. 539.
214. Waterhouse, A.M. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench / A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M. Martin, M. Clamp, G.J. Barton // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25. – №. 9. – P. 1189–1191.
215. Bendtsen, J.D. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion / J.D. Bendtsen, L.J. Jensen, N. Blom, G. Von Heijne, S. Brunak // *Protein Engineering Design and Selection*. – 2004. – Vol. 17. – №. 4. – P. 349–356.
216. Marchler-Bauer, A. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures / A. Marchler-Bauer, Y. Bo, L. Han, J. He, C.J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L.Y. Geer, S.H. Bryant // *Nucleic acids research*. – 2017. – Vol. 45. – №. D1. – P. D200–D203.

217. Madeira, F. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019 / F. Madeira, Y.M. Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan, A.R.N. Tivey, S.C. Potter, R.D. Finn, R. Lopez // *Nucleic acids research*. – 2019. – Vol. 47. – №. W1. – P. W636–W641.
218. Waterhouse, A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede // *Nucleic acids research*. – 2018. – Vol. 46. – №. W1. – P. W296–W303.
219. Krieger, E. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8 / E. Krieger, K. Joo, J. Lee, J. Lee, S. Raman, J. Thompson, M. Tyka, D. Baker, K. Karplus // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 77. – №. S9. – P. 114–122.
220. Benkert, P. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models / P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede // *Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 27. – №. 3. – P. 343–350.
221. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Žídek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis // *Nature*. – 2021. – Vol. 596. – №. 7873. – P. 583–589.
222. Bond, S.R. RF-Cloning. org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects / S.R. Bond, C.C. Naus // *Nucleic acids research*. – 2012. – Vol. 40. – №. W1. – P. W209–W213.
223. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures / F.W. Studier // *Protein expression and purification*. – 2005. – Vol. 41. – №. 1. – P. 207–234.
224. Bigge, J.C. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid / J.C. Bigge, T.P. Patel, J.A. Bruce, P.N. Goulding, S.M. Charles, R.B. Parekh // *Analytical biochemistry*. – 1995. – Vol. 230. – №. 2. – P. 229–238.
225. Fisher R.A. *Statistical Methods for Research Workers* / R.A. Fisher. – Edinburgh. : Oliver and Boyd, 1925.

Приложение 1

Скорректированные N-концевые аминокислотные последовательности фукоиданаз FWf1 (GenBank: ANW96097.1) и FWf3 (GenBank: ANW96115.1) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. Пропущенные аминокислотные последовательности FWf1 и FWf3 указаны подчеркнутым/курсивным шрифтом. Полноразмерным аминокислотным последовательностям FWf1 и FWf3 принадлежат идентификаторы GenBank: WP_083194609.1 и WP_083194615.1.

>FWf1 (WP_083194609.1)

MKKSIDLKLIFIVFSVFNMILINHIEAQKNDPNQGLRAHWLRGTWGINWKPVNLYNGGHE
GLSIEPFLNQISHIKTIDYIQVHLGESSIKSSVHMGPSLLESFWEGDTDANGDPINLVV
PRASYGEDPFLEIVKAIRAAGLKVMVYVNSSNMLSREGPGGSPDYIPNITERWKEWCDT
NAEAQAFIASQPYHTGVWDETSKYINSETEFPERKYMFCYAEFVLKEYAIRYGDLLDAW
CFDSGSWMGMNGDSQTNGIYEDQMIFNAFKAACHAGNPDAALSFQNSPERDTEELNPFSE
AVHADDFFMFGHPYNGGRDGGSHITIGTPSLYSRYAHIEKMKETNGYAHRGSDPQTWTWDD
NVVAHYDPPMSTTSWNGGNTPALTDEEFNLWNLEAVQNGGAISWGLPLVKKSGTNEQLVG
TDWALAQLNGMDAHLMELEAPGAPNWSRQETVLSEAKIGEYVHHVLEEGKDFWDPENIGA
ISLSLSDNVPTWITLEQTEPGIWTLSTDTKATTYVFDIVAQDTDGSNTRTVSLEVA
NDTKEEEMSVVIKAVANTNYGVDQTAIMYSDVLTALDGKATFKISVNVTPQIGKAISSGV
SGGLTTTQSWGLSGDEREGSKENMFYGEKVDWVTISDIQIIEFNANGGTLQESDFENITF
KSLMIVNGQTLGKDAIAFTINEETIELGNLDSNPFSELQDKNQTSFSIGIGNSVDQSSN
KWSVEEILSIDLSEMLSVEKVEKESVVLWPNPTSGIVHFDEINPQFIQVYDFNGRLLKS
EVSSANYLDVSEFNNGVYIFKFRLLNNGEVIHKKVIKKN

>FWf3 (WP_083194615.1)

MNVIKKSFTILCFILLLSNIIQAQVFYDKTSSSEVLSIEGGAVWDLSSNGDFVYNNNGS
NFQNRALIYSTSAYQSEDGFKLTIEYTTESIEDVVSHNFSFGLISDETNLSSYLGFPNFR
ANESVYSIGANLTTNEDATARGLNFTNGNERVTLDESGSRTQFGEGGITKVTEIGIGGY
WSYRINDIYEDSGVLLEGFDLSKNYHVAVYGQSNNGKSIQSITLEKRYALGERAVNLRGT
WNSEILVDLLDDRIKLNKTLNRLGVSTNGAVLSAEHKVPHKLFDRLSGGDVVAPSWGDL
NSDTPDNDNMLADILKIKAAAGFNVKAYTNSENFVGTNADYLQPFVDSWKEYCDTDPEVQA
FINSQPYHTGIWNRTTEQYEDATATYPNRKYMFCYAEYFLKDYALRYGEHFDSWIFDDGA
TMEQNGDNATSGVVEEQRIYQAYANAVHAGNPDAIAFNNRSTVNYKDYPFAHAVRFED
FTFGHAFGGNNHAEKINGNQFNLYRHITRMETENGLVHAGGNWDWDDKIVGNFHSKLS
TTAWKYGPNQAWAQADFNQWNLEAIQAGGSMTWGGSFNRAETAIDWVYVLLLEGLDDYLV
QYGNPGAPNWARQHTVLPAAHIGIPYHHVLVEGVDLWDPEGDEITEVIALGNFPSWLKIT
KKSPGEWTFSGTPTETNETHTFSLQASDASGVRTREVNLLVDEELEDPIAIKASSNTN
YGLNKAVMISDVYTAAPDGYATFRVSMVTPPSNKAVISGISGGTSTQNSWGLGDGTAN
MDDIFTGSDHEWVESINNLQIVDFNANGGDLTEDHFTLSFKAITIVNAQSTNDFVSLKFD
QTVVDLGLKLNQTTQIDLNSVSSINEITEFSLGTGNDSSNTKWSVEEILISLIVVGDLS
NSTIASEKNQTFKVYPNPTSHIINFNIPIHSVEVINTSGKVVKTNPNLTQSIKILDSSG
VYIHKGITELGATVVKKIVKNTN

Приложение 2

Таблица 1 – Идентичность аминокислотных последовательностей (полноразмерных) фукоиданаз FWf1, FWf2, FWf3, FWf4 (отмечено зеленым цветом) и охарактеризованных представителей семейства GH107, выраженная в процентах. Желтым цветом выделены самые высокие значения

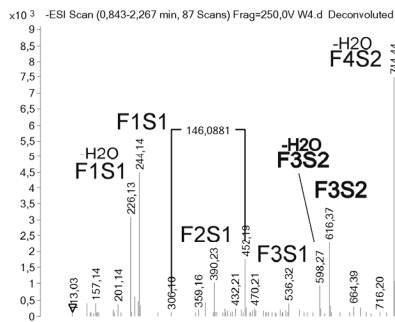
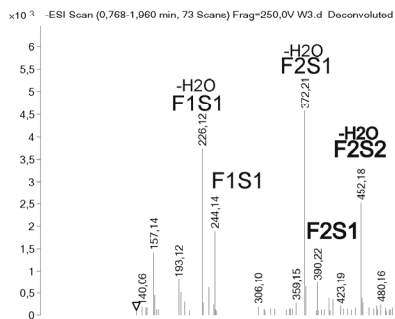
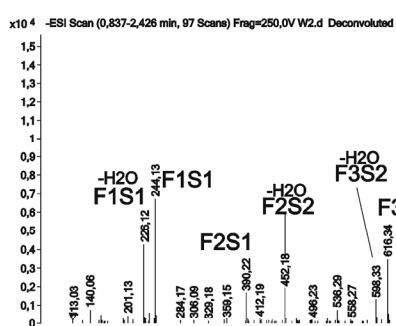
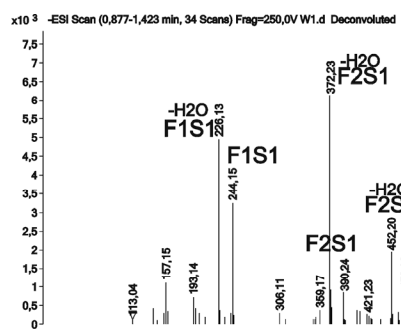
Название белка	SVI_0379	Fda1	Fda2	P19DFcnA	P5AFcnA	FWf2	Fp273	FFA2	FWf3	FWf4	FcnA	FFA1	FWF1	Fp277	Fp279
SVI_0379	100,00	31,65	30,76	19,60	18,63	19,83	19,40	18,22	18,75	22,06	19,02	18,85	19,95	20,33	18,78
Fda1	31,65	100,00	71,18	21,14	19,25	19,51	17,62	19,05	18,93	20,03	21,20	20,47	18,90	19,18	19,09
Fda2	30,76	71,18	100,00	22,19	20,18	20,16	17,72	19,67	18,80	19,80	21,15	21,26	18,92	19,86	18,46
P19DFcnA	19,60	21,14	22,19	100,00	69,52	17,70	18,27	18,21	18,12	17,29	17,34	17,87	18,50	16,67	18,82
P5AFcnA	18,63	19,25	20,18	69,52	100,00	16,57	17,59	16,67	17,19	15,56	16,23	16,18	17,84	16,47	17,32
FWf2	19,83	19,51	20,16	17,70	16,57	100,00	43,26	40,24	46,68	44,64	37,42	38,05	48,74	46,82	43,75
Fp273	19,40	17,62	17,72	18,27	17,59	43,26	100,00	34,57	54,03	35,29	34,26	33,29	34,50	39,44	36,79
FFA2	18,22	19,05	19,67	18,21	16,67	40,24	34,57	100,00	41,49	52,15	55,69	56,31	43,91	40,21	41,18
FWf3	18,75	18,93	18,80	18,12	17,19	46,68	54,03	41,49	100,00	63,54	40,94	41,11	39,25	37,55	37,08
FWf4	22,06	20,03	19,80	17,29	15,56	44,64	35,29	52,15	63,54	100,00	62,12	62,66	45,74	42,21	40,08
FcnA	19,02	21,20	21,15	17,34	16,23	37,42	34,26	55,69	40,94	62,12	100,00	66,77	45,57	39,70	39,81
FFA1	18,85	20,47	21,26	17,87	16,18	38,05	33,29	56,31	41,11	62,66	66,77	100,00	45,79	39,57	39,87
FWf1	19,95	18,90	18,92	18,50	17,84	48,74	34,50	43,91	39,25	45,74	45,57	45,79	100,00	52,40	47,56
Fp277	20,33	19,18	19,86	16,67	16,47	46,82	39,44	40,21	37,55	42,21	39,70	39,57	52,40	100,00	62,47
Fp279	18,78	19,09	18,46	18,82	17,32	43,75	36,79	41,18	37,08	40,08	39,81	39,87	47,56	62,47	100,00

Таблица 2 – Идентичность аминокислотных последовательностей каталитического домена (GH107) фукоиданаз FWf1, FWf2, FWf3, FWf4 (отмечено зеленым цветом) и охарактеризованных представителей семейства GH107, выраженная в процентах. Желтым цветом выделены самые высокие значения

Название белка	SVI_0379	Fda1	Fda2	P19DFcnA	P5AFcnA	FWf2	Fp273	FFA2	FWf3	FWf4	FcnA	FFA1	FWf1	Fp277	Fp279
SVI_0379/25-367	100,00	41,88	39,06	21,02	21,47	23,03	23,15	23,53	21,33	25,00	25,31	24,06	23,68	24,61	24,38
Fda1/23-372	41,88	100,00	70,69	24,17	24,00	24,06	23,69	22,15	23,79	23,10	23,10	21,78	23,13	24,43	25,16
Fda2/25-439	39,06	70,69	100,00	23,27	23,10	20,05	20,17	21,59	20,11	21,68	23,05	22,40	23,32	25,24	23,44
P19DFcnA/15-403	21,02	24,17	23,27	100,00	70,31	15,12	15,65	16,82	16,88	18,75	16,30	17,55	17,13	15,46	17,99
P5AFcnA/20-403	21,47	24,00	23,10	70,31	100,00	15,63	16,56	16,15	17,15	16,51	15,61	16,24	18,04	16,67	17,34
FWf2/162-679	23,03	24,06	20,05	15,12	15,63	100,00	44,35	44,72	44,79	46,77	44,30	43,26	51,70	52,57	48,57
Fp273/153-617	23,15	23,69	20,17	15,65	16,56	44,35	100,00	36,93	70,35	36,46	36,84	34,35	40,42	41,22	40,46
FFA2/33-433	23,53	22,15	21,59	16,82	16,15	44,72	36,93	100,00	36,09	58,97	62,98	61,95	50,25	45,5	45,82
FWf3/134-589	21,33	23,79	20,11	16,88	17,15	44,79	70,35	36,09	100,00	37,01	35,69	34,28	39,30	40,38	41,21
FWf4/31-421	25,00	23,10	21,68	18,75	16,51	46,77	36,46	58,97	37,01	100,00	77,95	79,23	49,87	46,84	46,35
FcnA/29-418	25,31	23,10	23,05	16,30	15,61	44,30	36,84	62,98	35,69	77,95	100,00	82,82	51,17	44,47	45,95
FFA1/26-415	24,06	21,78	22,40	17,55	16,24	43,26	34,35	61,95	34,28	79,23	82,82	100,00	51,95	45,26	46,74
FWf1/11-423	23,68	23,13	23,32	17,13	18,04	51,70	40,42	50,25	39,30	49,87	51,17	51,95	100,00	68,23	61,22
Fp277/24-435	24,61	24,43	25,24	15,46	16,67	52,57	41,22	45,50	40,38	46,84	44,47	45,26	68,23	100,00	66,18
Fp279/27-449	24,38	25,16	23,44	17,99	17,34	48,57	40,46	45,82	41,21	46,35	45,95	46,74	61,22	66,18	100,00

Приложение 3

Спектры ИЭР-МС продуктов ферментативного гидролиза фукоидана FeF из *F. evanescens* НМП_FWf1, НМП_FWf2, НМП_FWf3 и НМП_FWf4, режим регистрации отрицательных ионов [M-H]⁻ после деконволюции ионов из мультизаряженных в нейтральные.



Хроматограммы (общий ионный ток) продуктов ферментативного гидролиза фукоидана FeF из *F. evanescens* НМП_FWf1, НМП_FWf2, НМП_FWf3 и НМП_FWf4.

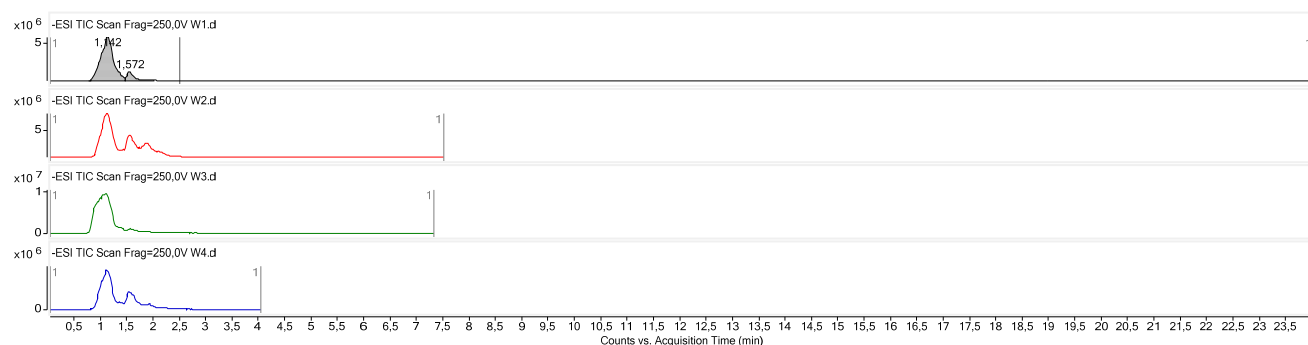


Таблица 1 – Результаты масс-спектрометрического исследования продуктов ферментативного гидролиза фукоидана FeF из *F. evanescens* НМП_FWf1, НМП_FWf2, НМП_FWf3 и НМП_FWf4 с помощью квадрупольно-времяпролетного хроматомасс-спектрометра высокого разрешения с ионизацией электрораспылением

Состав	<i>m/z</i>	НМП_FWf1	НМП_FWf2	НМП_FWf3	НМП_FWf4
F2S1 -H ₂ O	372,2	+++		+++	+
F2S1	390,2	+	+	+	+
F2S2 -H ₂ O	452,2	++	+	++	+
F2S2	470,3	+			
F3S2 -H ₂ O	598,4	+	+	+	+
F3S2	616,4	++	++	+	+
F4S2 -H ₂ O	744,4		+++	+	+++
F4S2	762,5	+	+	+	+
F5S2	908,5		+		+
F5S3	988,6	мало	мало		мало
F6S2	1054,6		мало		
F6S3	1134,6	мало	+	+	
F8S3	1426,8		+		+
F8S4 -H ₂ O	1478,6	мало	мало		мало
F8S4	1506,8		мало		мало
F10S4	1799,1		мало		мало
F11S4	1916,8		мало		
F11S5 -H ₂ O	1996,9		мало		мало

Приложение 4

Таблица 1 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции ВМП_FWf1 и ВМП_FWf2

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₁	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,41/ 94,7	4,51/ 76,5	4,22/ 68,3	3,99/ 83,3	4,53/ 68,9	1,39/ 16,8
b ₁	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,40/ 98,8	4,48/ 77,2	4,38/ 68,3	4,01/ 83,8	4,40/ 69,6	1,38/ 16,9
c ₁	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-	5,35/ 100,0	4,58/ 75,7	4,31/ 74,4	4,98/ 81,2	4,52/ 68,7	1,31/ 17,1
d ₁	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4-	5,24/ 100,2	4,60/ 74,6	4,18/ 73,3	4,14/ 69,7	4,48/ 68,1	1,24/ 16,6

Таблица 2 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции ВМП_FWf3

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₁	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4-	5,24/ 100,2	4,59/ 74,6	4,18/ 72,9	4,13/ 83,3	4,48/ 68,0	1,24/ 16,6
b ₁	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,42/ 94,2	4,51/ 76,5	4,22/ 68,3	3,99/ 83,2	4,51/ 68,8	1,38/ 16,7
c ₁	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-*	5,36/ 100,1	4,56/ 75,7	4,32/ 74,6	4,96/ 81,2	4,50/ 68,8	1,31/ 17,1
d ₁	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-*	5,31/ 100,2	4,58/ 74,6	4,30/ 74,6	4,95/ 80,8	4,52/ 68,8	1,30/ 17,2

Примечание.* – остатки содержатся в минорных количествах

Таблица 3 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции ВМП_FWf4

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₁	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,38/ 99,3	4,44/ 77,4	4,38/ 68,5	4,01/ 83,9	4,39/ 69,7	1,37/ 16,9
b ₁	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-	5,37/ 99,9	4,56/ 76,0	4,32/ 75,0	4,97/ 81,4	4,49/ 68,8	1,31/ 17,1

Таблица 4 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf1-Фр1

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₁	α-L-Fucp(2,3SO ₃ ⁻)-1→3-	5,50/ 91,8	4,54/ 74,7	4,05/ 75,0	4,09/ 70,4	4,23/ 67,1	1,24/ 16,7
b ₁	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4-	5,37/ 96,3	4,63/ 73,8	4,75/ 75,2	4,28/ 80,9	4,55/ 69,0	1,40/ 16,8
c ₁	→4-α-L-Fucp(2,3SO ₃ ⁻)-1→3-	5,34/ 97,9	4,46/ 76,7	4,28/ 68,5	3,90/ 73,4	4,40/ 68,5	1,24/ 16,4
d ₁	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)	5,32/ 100,0	4,58/ 75,1	4,32/ 73,4	4,94/ 80,9	4,49/ 68,7	1,35/ 17,1

Таблица 5 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf1-Фр2

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₂	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,50/ 91,7	4,54/ 74,6	4,06/ 74,8	4,09/ 70,3	4,23/ 67,1	1,24/ 16,6
b ₂	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-	5,39/ 95,8	4,58/ 73,6	4,73/ 76,3	4,22/ 71,8	4,58/ 67,7	1,25/ 16,4
c ₂	→4-α-L-Fucp(2,3SO ₃ ⁻)-1→3-	5,37/ 96,2	4,65/ 73,7	4,76/ 75,1	4,28/ 80,4	4,55/ 69,0	1,40/ 16,8
d ₂	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)	5,29/ 99,9	4,59/ 74,6	4,20/ 74,4	4,12/ 70,5	4,43/ 68,3	1,30/ 16,5

Таблица 6 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf2-Фр1

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₃	$\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,49/ 91,7	4,51/ 74,6	4,05/ 73,9	4,08/ 69,9	4,23/ 67,2	1,24/ 16,5
b ₃	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,35/ 95,1	4,45/ 76,5	4,10/ 68,6	3,90/ 73,4	4,51/ 68,0	1,23/ 16,4
c ₃	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,34/ 95,4	4,48/ 76,6	4,16/ 68,6	3,99/ 83,7	4,52/ 68,9	1,38/ 16,8
d ₃	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,28/ 100,4	4,58/ 74,7	4,18/ 73,5	4,12/ 70,0	4,42/ 68,6	1,24/ 16,7

Таблица 7 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf2-Фр2

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₄	$\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,48/ 91,7	4,51/ 74,7	4,06/ 73,7	4,08/ 69,8	4,23/ 67,2	1,24/ 16,6
b ₄	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,36/ 94,9	4,46/ 76,5	4,11/ 68,7	3,90/ 73,3	4,51/ 68,0	1,23/ 16,4
c ₄	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,35/ 95,2	4,48/ 76,6	4,17/ 68,7	4,00/ 83,9	4,57/ 68,9	1,38/ 16,8
d ₄	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,35/ 95,2	4,48/ 76,6	4,15/ 68,7	4,00/ 83,9	4,52/ 68,9	1,39/ 16,8
e ₄	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,29/ 100,4	4,58/ 74,7	4,19/ 73,6	4,13/ 69,9	4,41/ 68,6	1,25/ 16,6
f ₄	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,29/ 100,4	4,58/ 74,7	4,19/ 73,6	4,12/ 70,0	4,41/ 68,6	1,25/ 16,7

Таблица 8 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf2-Фр3

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₅	$\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,48/ 91,7	4,51/ 74,7	4,06/ 73,7	4,09/ 69,8	4,23/ 67,2	1,24/ 16,6
b ₅	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,36/ 94,9	4,46/ 76,5	4,10/ 68,5	3,90/ 73,3	4,51/ 68,0	1,23/ 16,4
c ₅	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,36/ 95,2	4,48/ 76,6	4,17/ 68,6	4,00/ 83,9	4,57/ 68,8	1,38/ 16,8
d ₅	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,36/ 95,2	4,48/ 76,6	4,17/ 68,6	4,00/ 83,9	4,57/ 68,8	1,38/ 16,8
e ₅	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,35/ 95,3	4,48/ 76,6	4,16/ 68,7	4,00/ 84,1	4,52/ 68,9	1,39/ 16,8
f ₅	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,29/ 100,3	4,58/ 74,7	4,19/ 73,6	4,13/ 69,9	4,40/ 68,6	1,25/ 16,6
g ₅	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,29/ 100,3	4,58/ 74,7	4,19/ 73,6	4,13/ 69,9	4,40/ 68,6	1,25/ 16,6
h ₅	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,29/ 100,4	4,58/ 74,7	4,19/ 73,5	4,13/ 70,0	4,40/ 68,6	1,25/ 16,7

Таблица 9 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf3-Фр3

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a ₆	$\beta\text{-L-Fucp-1}\rightarrow$	4,71/ 102,4	3,92/ 71,8	3,76/ 72,5	3,98/ 71,8		
b ₆	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp-1}\rightarrow$	5,03/ 100,6	3,97/ 65,7	4,18/ 70,4	4,22/ 81,2	4,79/ 68,5	

Продолжение таблицы 9

c₆	→3-β-L-Fucp-1→	4,64/ 101,1	4,02/ 71,1	3,78/ 76,7	3,90/ 71,9		
d₆	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,35/ 97,5	4,46/ 76,7	4,25/ 68,4	3,90/ 73,3		
e₆	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-	5,32/ 100,2	4,59/ 74,8	4,31/ 73,1	4,95/ 80,3		
f₆	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,37/ 97,9	4,49	4,31/ 68,4	4,00/ 83,9		
g₆	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)	5,52/ 91,6	4,52	4,22	4,93/ 80,6		

Таблица 10 – Химические сдвиги ядер ¹H и ¹³C (м. д.) в спектрах ЯМР ¹H/¹³C фракции FWf3-Фр4

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a₇	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,35/ 97,5	4,46/ 76,6	4,23/ 68,4	3,90/ 73,3	4,40/ 67,7	1,24/ 16,5
b₇	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→4-	5,32/ 100,3	4,58	4,31/ 72,9	4,94/ 80,2	4,31/ 68,4	
c₇	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,36/ 97,5	4,49/ 76,6	4,30/ 68,4	4,00/ 84,0	4,42	1,38
d₇	→3-α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)	5,51	4,54/ 76,6	4,24	4,92		
e₇	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,28/ 99,2	4,46/ 76,6	4,19/ 68,4	3,89/ 73,4	4,51/ 68,8	1,23/ 16,5
f₇	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4-	5,28	4,58	4,20	4,12/ 69,4	4,40	1,24/ 16,6
g₇	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,30/ 100,0	4,46/ 76,6	4,21/ 68,5	4,00/ 84,0	4,50/ 68,8	1,38/ 16,9
h₇	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)	5,48/ 91,7	4,54	4,01	4,08		
i₇	α-L-Fucp(2,4SO ₃ ⁻)-1→	5,44/ 100,1	4,43/ 76,7	4,28/ 68,4	4,71/ 82,4	4,35/ 67,8	
j₇	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-	5,56/ 91,6	4,53/ 76,6	4,02	4,16/ 77,8		
k₇	α-L-Fucp(4SO ₃ ⁻)-1→	5,47/ 100,2	3,87/ 70,6	4,15/ 69,4	4,64/ 82,1		
l₇	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-	5,55/ 91,6	4,58	4,08	4,19/ 77,8		
m₇	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→	5,25/ 100,4	4,42/ 76,8	4,22	3,88/ 73,4		
n₇	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→	5,35	4,68/ 75,2	4,19	4,22/ 78,0		

Таблица 11 – Химические сдвиги ядер ¹H и ¹³C (м. д.) в спектрах ЯМР ¹H/¹³C фракции FWf4-Фр3

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a₈	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,36/ 94,8	4,47/ 76,6	4,10/ 68,6	3,90/ 73,4	4,50/ 68,0	1,24/ 16,4
b₈	→3-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→4-	5,29/ 100,4	4,59/ 74,9	4,20/ 73,4	4,13/ 69,9	4,39/ 68,5	1,25/ 16,6
c₈	→4-α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,36/ 95,0	4,49/ 76,6	4,18/ 68,7	4,00/ 84,0	4,53/ 68,7	1,38/ 16,8
d₈	α-L-Fucp(2SO ₃ ⁻)-1→3-	5,36/ 97,4	4,47/ 76,6	4,27/ 68,5	3,90/ 73,4	4,39/ 68,5	1,25/ 16,6

Продолжение таблицы 11

e₈	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 4\text{-}$	5,31/ 99,9	4,59/ 74,9	4,32/ 72,9	4,94/ 80,6	4,51/ 68,7	1,35/ 17,1
f₈	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}$	5,37/ 96,2	4,64/ 73,8	4,75/ 75,2	4,28/ 80,8	4,58/ 68,9	1,38/ 16,8
g₈	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,48/ 91,8	4,52/ 76,7	4,07/ 75,0	4,09/ 69,9	4,23/ 67,1	1,25/ 16,7
h₈	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,50/ 91,8	4,52/ 76,7	4,07/ 75,0	4,09/ 69,9	4,23/ 67,1	1,25/ 16,7

Таблица 12 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf4-Фр4

Остаток	Структура	H1	H2	H3	H4	H5	H6
a₉	$\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}$	5,35	4,46	4,27	3,90	4,40	1,24
b₉	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 4\text{-}$	5,32	4,59	4,32	4,94	4,50	1,35
c₉	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}$	5,37	4,64	4,75	4,28	4,56	1,40
d₉	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 4\text{-}$	5,29	4,58	4,20	4,12	4,40	1,25
e₉	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}$	5,36	4,48	4,16	4,00		
f₉	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,48	4,54	4,05	4,09	4,23	1,25
g₉	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,50	4,54	4,05	4,09	4,23	1,25

Таблица 13 – Химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C (м. д.) в спектрах ЯМР $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ фракции FWf4-Фр5

Остаток	Структура	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
a₁₀	$\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}$	5,36/ 94,9	4,44/ 76,3	4,09/ 69,6	3,89/ 73,1	4,50/ 68,1	1,22/ 16,4
b₁₀	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 4\text{-}$	5,28/ 100,0	4,57/ 74,5	4,18/ 73,0	4,12/ 69,4	4,40/ 68,4	1,23/ 16,4
c₁₀	$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow 3\text{-}$	5,36/ 94,7	4,47/ 76,4	4,18/ 68,4	3,99/ 83,7	4,54/ 68,6	1,37/ 16,6
d₁₀	$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,47/ 91,5	4,50/ 76,4	4,06	4,08/ 69,6	4,23/ 66,9	1,23/ 16,4

Приложение 5

Таблица 1 – Химические сдвиги ядер ^1H (м. д.) в спектрах ЯМР ^1H фракции 1АаF2-Фр2

Остаток	Структура	H1	H2	H3	H4	H5	H6
a₁₁	$\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,39	4,53	4,89	4,21	4,37	1,23
b₁₁	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)$	5,53	4,53	4,31	4,92	4,34	1,30

Таблица 2 – Химические сдвиги ядер ^1H (м. д.) в спектрах ЯМР ^1H фракции 1АаF2-Фр4

Остаток	Структура	H1	H2	H3	H4	H5	H6
a₁₂	$\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,35	4,46	4,27	3,90	4,39	1,25
b₁₂	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,33	4,58	4,32	4,92	4,50	1,34
c₁₂	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,44	4,63	4,90	4,29	4,41	1,39
d₁₂	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,4\text{SO}_3^-)$	5,52	4,55	4,35	4,91	4,34	1,31

Таблица 3 – Химические сдвиги ядер ^1H (м. д.) в спектрах ЯМР ^1H фракции 1АаF2-Фр5

Остаток	Структура	H1	H2	H3	H4	H5	H6
a₁₃	$\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,39	4,57	4,72	4,22	4,59	1,25
b₁₃	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{4-}$	5,29	4,59	4,20	4,12	4,43	1,30
c₁₃	$\rightarrow\text{4-}\alpha\text{-L-Fucp}(2,3\text{SO}_3^-)\text{-1}\rightarrow\text{3-}$	5,37	4,64	4,75	4,28	4,55	1,40
d₁₃	$\rightarrow\text{3-}\alpha\text{-L-Fucp}(2\text{SO}_3^-)$	5,50	4,54	4,05	4,12	4,23	1,25